

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

**LSox5 EN EL DESARROLLO DE
LA CRESTA NEURAL**

TESIS DOCTORAL

Siro Pérez Alcalá



MINISTERIO
DE EDUCACION
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

Instituto de Neurobiología "Ramón y Cajal"

INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS

Título: "**LSox5 en el desarrollo de la cresta neural**"

Autor: **Siro Pérez Alcalá**

Julio Alberto Barbas González, Científico Titular del Instituto Cajal del CSIC y director del trabajo

INFORMA

Que la memoria presentada por **Siro Pérez Alcalá** para optar al título de **Doctor en Ciencias** reúne las condiciones de originalidad y rigor científico necesarias para ser defendida ante el Tribunal correspondiente de la **Universidad Autónoma de Madrid**.

En la presente memoria se describe la caracterización estructural y funcional del factor de transcripción LSox5 del pollo. Se detalla la clonación del cDNA correspondiente y se analizan tanto la organización estructural del gen como la estructura y dominios funcionales de la proteína. Se describe la obtención y caracterización de anticuerpos específicos y, utilizando éstos como herramienta en inmunohistoquímica, así como mediante la técnica de hibridación *in situ*, se analiza en profundidad su patrón de expresión durante el desarrollo en el embrión de pollo, especialmente en la cresta neural y sus derivados. Después de diversos ensayos funcionales, utilizando la técnica de electroporación en el embrión *in ovo*, se demuestra la implicación de LSox5 en la generación de la cresta neural, y localiza dicho factor en la cascada génica que lleva a la formación de la misma.

Estos resultados son originales y representan una importante aportación a los campos del desarrollo de la cresta neural y de la función de los factores de transcripción de la familia Sox.

En Madrid, a 10 de mayo de 2004.

Firmado:

El Director de Tesis

Julio Alberto Barbas

Avda Doctor Arce 37
28002 Madrid ESPAÑA
Telf. 91 5854750

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

**LSox5 EN EL DESARROLLO DE
LA CRESTA NEURAL**

Memoria presentada por el licenciado
Siro Pérez Alcalá para optar al grado
de Doctor en Ciencias.

Director: Dr. Julio Alberto Barbas González
Científico Titular del CSIC

Madrid, Mayo de 2004

*I have't. It is engender'd. Hell and night
Must bring this monstrous birth to the world's light.*

Iago, Act I, Scene III: A council-chamber.

Esta tesis ha sido realizada gracias a
la concesión de una beca predoctoral
del Ministerio de Educación y Cultura
(FP99 05433149)

Para Eva

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis, sin duda, nunca hubiera sido posible sin el apoyo de muchas personas, pero fundamentalmente de Julio. Deseo expresarle mi gratitud por la paciencia que ha tenido conmigo a lo largo de todos estos años, y especialmente durante la elaboración de esta memoria. Le agradezco lo que me ha enseñado sobre la Ciencia, pero aprecio sobre todo su amistad, y que haya intentado civilizarme un poco...

Agradezco a Ángela, mi "jefa" adoptiva, que me diera ánimos cuando el cansancio empezaba a hacer mella en mí, y que me mostrara el Norte cuando lo perdía. Su apoyo técnico y material fue también absolutamente imprescindible. A este respecto, agradecer igualmente la paciencia de Jose M^a Frade, Alberto Ferrús y Paola Bovolenta, cuyos laboratorios me sirvieron de "campamentos intermedios" en mis numerosas "expediciones" por el Instituto.

A todos mis compañeros del Cajal, quisiera darles las gracias por los ánimos que me han dado para poder llegar hasta aquí, y por haber constituido un modelo a seguir, tanto por su rigor científico como por su calidad humana. A Noelia, Ruth y Vanessa, por su amistad dentro y fuera del laboratorio; a los "habituales del fin de semana" (Noe, Cristina, Julián, Ivan, Óscar, Josanna...) por hacer más llevadero trabajar a deshoras.

Agradecer también a los compañeros del servicio técnico y del almacén que con su humor ayuden a olvidar las pequeñas frustraciones que da el trabajo experimental; a los compañeros de seguridad, Miguel Ángel y Carmen, que me echaran una mano cuando había que poner huevos en la incubadora a altas horas de la madrugada.

Por último, agradecer a Eva que le de un sentido a mi vida, y que comparta la suya conmigo; a Rubén su amistad y que aguante mis extrañas elucubraciones. A mi familia, a los que debo todo lo que soy, le agradezco el cariño y el apoyo incondicional que me han dado siempre.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	2
1. SUMMARY.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2. 1. LA CRESTA NEURAL.....	6
2. 1. 1. Inducción de la cresta neural.....	7
2. 1. 2. Transición Epitelio-Mesénquima.....	10
2. 1. 3. Migración y derivados de la cresta neural.....	13
2. 1. 3. 1. Migración y derivados de la cresta neural troncal.....	13
2. 1. 3. 2. Migración y derivados de la cresta neural cefálica.....	16
2. 2. LOS GANGLIOS CRANEALES.....	18
2. 3. LA FAMILIA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SOX.....	21
2. 3. 1. La caja HMG.....	22
2. 3. 2. Análisis filogenético y estructural de la familia Sox.....	25
2. 3. 3. Los genes Sox en el desarrollo embrionario.....	29
2. 3. 3. 1. Las proteínas Sox en la condrogénesis.....	30
2. 3. 3. 2. Las proteínas Sox en el desarrollo de la cresta neural.....	32
3. OBJETIVOS.....	36

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4. 1. EMBRIONES DE POLLO.....	38
4. 2. CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DEL LSox5 DE POLLO.....	38
4. 3. PLÁSMIDOS USADOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN EL EMBRIÓN DE POLLO.....	39
4. 4. ELECTROPORACIÓN <i>IN OVO</i>.....	40
4. 5. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU IN TOTO</i>.....	41
4. 6. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LSox5.....	41
4. 7. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA.....	43
4. 8. PRODUCCIÓN DE RETROVIRUS E INFECCIÓN DE CULTIVOS DE CEFs.....	43
5. RESULTADOS.....	46
5. 1. CLONACIÓN Y ANÁLISIS DE LSox5.....	46
5. 1. 1. Obtención de cDNAs completos de <i>LSox5</i>	46
5. 1. 2. Verificación de los sueros α -LSox5.....	47
5. 1. 3. Análisis estructural de la proteína.....	48
5. 1. 4. Análisis genómico del gen <i>Sox5</i> de pollo.....	51
5. 2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LSox5.....	54
5. 2. 1. Expresión del mRNA de <i>LSox5</i> en territorio de cresta neural.....	54

5. 2. 2. Comparación del inicio de expresión de LSox5 y otros marcadores de cresta neural.....	56
5. 2. 3. Inmunohistoquímica de LSox5 en la cresta neural.....	58
5. 2. 4. Expresión de LSox5 en los precursores de las células de Schwann.....	60
5. 2. 5. Expresión de LSox5 en los ganglios craneales.....	62
5. 2. 6. Expresión de LSox5 en el sistema nervioso central.....	66
 5. 3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LSox5 EN LA CRESTA NEURAL....	68
5. 3. 1. La sobre-expresión de LSox5 en el tubo neural cefálico produce un aumento de la población de células marcadas con HNK1.....	69
5. 3. 2. La sobre-expresión de LSox5 en el tubo neural cefálico produce un aumento de la expresión de <i>FoxD3</i> y <i>Sox10</i> , característicos de los derivados no neurales de la cresta neural.....	71
5. 3. 3. El aumento de la producción de cresta neural provocado por la sobre-expresión de LSox5 no parece estar mediado por factores solubles de las familias BMP o Wnt.....	73
5. 3. 4. La sobre-expresión de LSox5 afecta al mecanismo de delaminación de la cresta neural.....	75
5. 3. 5. La inducción de <i>RhoB</i> en una respuesta inmediata a la sobre-expresión de LSox5 en el tubo neural cefálico.....	77
5. 3. 6. Dominios funcionales de LSox5 implicados en la generación de cresta neural cefálica.....	79
 6. DISCUSIÓN.....	83
 6. 1. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>Sox5</i> DE POLLO.....	83
 6. 2. EXPRESIÓN DE LSox5 DURANTE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE POLLO.....	85

6. 3. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LSox5 INDUCE DE FORMA INMEDIATA LA EXPRESIÓN DE <i>RhoB</i>.....	88
6. 4. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LSox5 AUMENTA LA GENERACIÓN DE CRESTA NEURAL CEFÁLICA.....	90
7. CONCLUSIONES.....	97
8. BIBLIOGRAFÍA.....	100

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato 4-toluidina
BMP	Proteína morfogenética del hueso
Bp	Pares de bases
cDNA	DNA copia
CEF	Fibroblastos embrionarios de pollo
CME	Componentes de matriz extracelular
DAB	Diaminobencidina
DiI	Marcador vital lipofílico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRG	Ganglio de la raíz dorsal
E	Día embrionario de desarrollo
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
EST	Fragmentos de secuencias expresadas
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GTPasa	Enzima que une e hidroliza GTP
HH	Estadio de desarrollo según Hamburger y Hamilton
HLH	Hélice-lazo-hélice
HMG	Grupo de alta movilidad de unión a DNA
INT	Cloruro de 2-4-iodofenil- 5-4-nitrofenil-3-feniltetrazolio
kDa	Kilodaltons
mRNA	RNA mensajero
NBT	Cloruro azul de 4-Nitro tetrazolio
NES	Secuencia de exportación nuclear
NLS	Secuencia de localización nuclear
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PKA	Proteína quinasa A
RCAS	Vector competente de replicación basado en RSV
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	PCR con retrotranscripción previa
RSV	Virus del sarcoma de Rous
TEM	Transición epitelio-mesénquima
UTP	Uridina 5'-Trifosfato

SUMMARY

1. SUMMARY

Members of the Sox family of transcription factors are involved in a number of critical developmental processes, including sex determination, neurogenesis and skeletal development. *LSox5* belongs to group D Sox factors and, in conjunction with *Sox6* and *Sox9*, has been described to promote chondrogenesis by activating the expression of cartilage specific extracellular matrix molecules. We have cloned the chicken homologue of *LSox5* and found that it is initially expressed in the premigratory and migratory neural crest after *Slug*, *Sox9* and *FoxD3*. Subsequently, the expression of *LSox5* is maintained in cephalic crest derivatives and it appears to be required for the development of the glial lineage, the Schwann cells and satellite glia in the cranial ganglia.

Misexpression of *LSox5* in the cephalic neural tube immediately activated *RhoB* expression throughout the dorso-ventral axis. Furthermore, the prolonged forced expression of *LSox5* enlarged the dorsal territory in which the neural crest is generated, increased the “temporal window” of neural crest segregation, and led to an overproduction of neural crest cells in cephalic regions. In addition to the HNK-1 epitope, genes like *Sox10* and *Pax7* were upregulated in the cells delaminating from, and situated within, this extended dorsal region of neural crest generation, while the expression of genes like *N-cadherin*, *Wnt1* and *BMP7* diminished in the same area. Moreover, the additional neural crest cells expressed putative upstream markers (*Slug*, *FoxD3*) indicating that a regulatory feedback mechanism may operate during neural crest generation.

Thus, our data show that in addition to group E Sox genes (*Sox9* and *Sox10*) a group D gene (*Sox5*) also participates in neural crest development, and suggest that a cooperative interaction may operate during this process, similar to the one described taking place at the formation of cartilage.

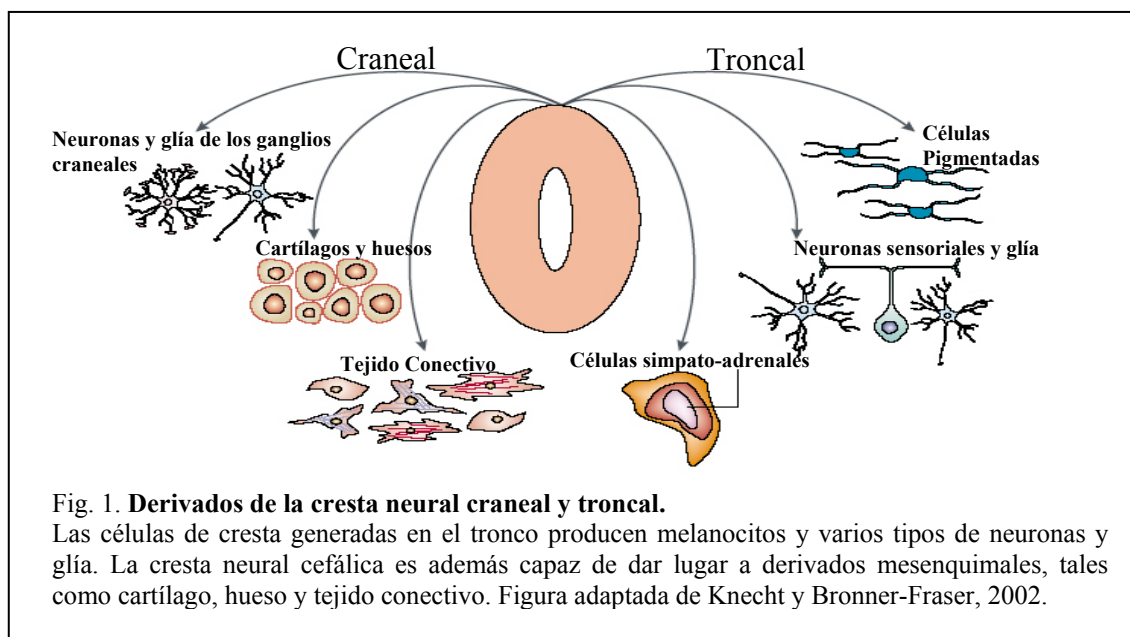
INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2. 1. LA CRESTA NEURAL

Un auténtico paradigma de los procesos de desarrollo, la cresta neural es una población transitoria de células migratorias multipotentes producida a partir de los extremos del pliegue neural, en una región entre la placa neural y la epidermis prospectiva.

La cresta neural fue una adquisición evolutiva en el paso de aparición de los vertebrados y, junto con las placodas ectodérmicas, es en gran parte responsable de las características más novedosas de los vertebrados, tales como la existencia de órganos sensoriales simétricos y la posibilidad de generar una gran variedad de estructuras craneofaciales (Northcutt y Gans, 1983). Curiosamente, en el anfioxo, que es el invertebrado existente más próximo a los vertebrados, se han podido clonar muchos de los genes que en vertebrados están relacionados con la formación de la cresta neural. Esto indicaría que esta población celular surgió por la utilización de genes preexistentes para funciones diferentes a las que tenían establecidas, más que por la aparición de nuevos genes (Holland y Holland, 2001).



El desarrollo de la cresta neural progresa secuencialmente a partir de una especificación inicial, seguida de la delaminación de las células tras una transición epitelio-mesénquima, y una migración final a lo largo de vías características para dar lugar a la formación de una amplia gama de derivados (LeDouarin y Kalcheim, 1999) (Fig. 1).

2. 1. 1. Inducción de la cresta neural

En el caso bien estudiado del embrión de pollo, la delaminación de la cresta neural tiene lugar una vez cerrado por completo el tubo neural. Sin embargo, la inducción de la cresta comienza mucho antes, en la fase de placa neural abierta, aunque el proceso de inducción se mantiene una vez se ha cerrado el tubo neural, y se puede así conferir identidades diferenciales a las nuevas poblaciones de cresta neural generadas.

Dado que los progenitores de la cresta neural se encuentran en los bordes de la placa neural, en la zona adyacente al ectodermo no neural, se puede considerar que la especificación de la propia placa neural y sus bordes constituyen el primer paso en la inducción de la cresta neural. Durante la gastrulación, el ectodermo es inducido a formar tejido neural por medio de señales secretadas por una región especializada del mesodermo conocida como el nodo de Hensen. La naturaleza de dichas señales y el modo en que interaccionan entre sí es un punto controvertido, ya que experimentos realizados en diversos animales modelo, como *Xenopus*, el pollo y zebrafish, sugieren modelos a veces contradictorios.

Así, en *Xenopus*, el ectodermo expresa BMP4 inicialmente, y la unión de éste a sus receptores es posteriormente bloqueada por la acción de antagonistas que son secretados por el nodo de Hensen, como noggin, chordin y follistatin, creándose un gradiente de acción de BMPs que especifica el ectodermo neural, el no neural, y la zona de inducción de cresta neural entre ambos (Mayor *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1997; Marchant *et al.*, 1998) (Fig. 2).

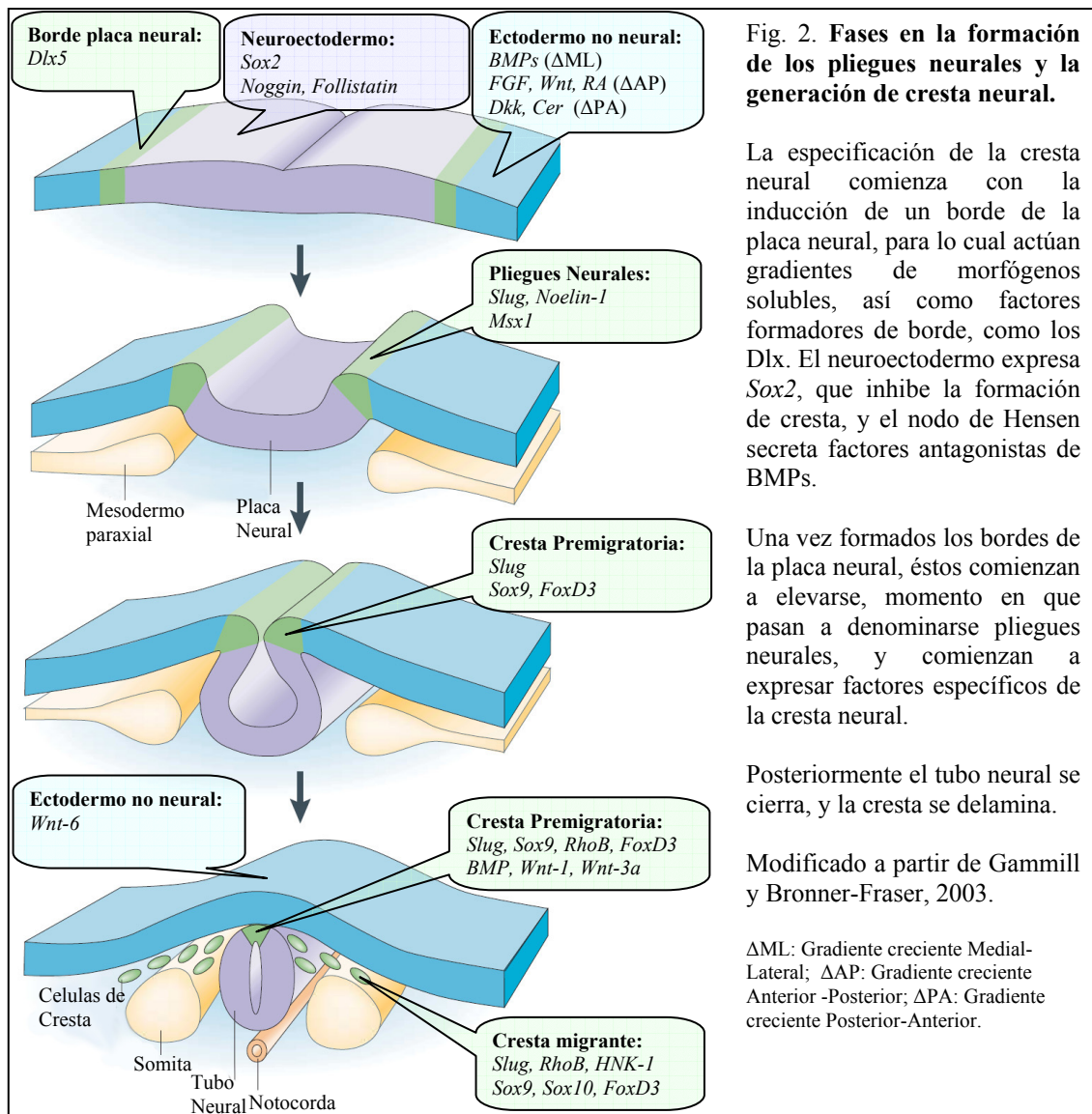


Fig. 2. Fases en la formación de los pliegues neurales y la generación de cresta neural.

La especificación de la cresta neural comienza con la inducción de un borde de la placa neural, para lo cual actúan gradientes de morfógenos solubles, así como factores formadores de borde, como los *Dlx*. El neuroectodermo expresa *Sox2*, que inhibe la formación de cresta, y el nodo de Hensen secreta factores antagonistas de BMPs.

Una vez formados los bordes de la placa neural, éstos comienzan a elevarse, momento en que pasan a denominarse pliegues neurales, y comienzan a expresar factores específicos de la cresta neural.

Posteriormente el tubo neural se cierra, y la cresta se delamina.

Modificado a partir de Gammill y Bronner-Fraser, 2003.

Δ ML: Gradiente creciente Medial-Lateral; Δ AP: Gradiente creciente Anterior-Posterior; Δ PA: Gradiente creciente Posterior-Anterior.

Sin embargo, en el embrión de pollo la expresión de *BMP4* y *BMP7* desaparece del ectodermo antes de la gastrulación (Streit *et al.*, 1998), aunque parece que podría reactivarse un poco después (Faure *et al.*, 2002), y que señales opuestas de *BMP4* y FGFs podrían estar implicadas en la especificación del borde de la placa neural (Streit y Stern, 1999).

En cualquier caso, aunque niveles intermedios de BMPs podrían ser necesarios para la inducción de la cresta neural, parece claro que ésta necesita de la acción de otros factores, como miembros de la familia de los FGFs, Wnts, ácido retinoico y noelin-1 (Liem *et al.*, 1995; Selleck *et al.*, 1998; Garcia-Castro *et al.*, 2002; Villanueva *et al.*, 2002; Barembaum *et*

al., 2000). Algunos de estos factores se expresan con un gradiente antero-posterior creciente, mientras que factores antagónicos lo hacen con un gradiente inverso, como *dickkopf* y *cerberus*, que son inhibidores de Wnt (Kazanskaya *et al.*, 2000; Bowmeester *et al.*, 1996), de modo que especifican el borde de la placa neural anterior.

Además, se ha encontrado que es necesaria también la acción de genes de la familia *Dlx* para la formación del borde de la placa neural. La expresión ectópica de *Dlx5* produce un borde de placa neural que expresa factores característicos de los pliegues neurales como *Msx1* o *BMP4*, pero no es capaz de inducir la activación de genes implicados en la especificación de la cresta neural. Para esto último es necesaria además la interacción entre el ectodermo neural y no-neural. Por lo tanto, la actividad de las proteínas *Dlx* es necesaria para la formación del borde de la placa neural, pero la inducción de la cresta neural requiere señales adicionales (Yang *et al.*, 1998; McLarren *et al.*, 2003; Woda *et al.*, 2003).

Una vez se ha especificado inicialmente el territorio a partir del cual surgirá la cresta neural, diversos factores de transcripción comienzan a cobrar protagonismo, aunque el momento en que aparecen y las relaciones entre ellos no han sido claramente establecidas. Parte de esta confusión podría estar originada por las diferencias mecánicas que existen a lo largo del eje antero-posterior, así como por diferencias entre especies. Estos aspectos no son muchas veces tenidos en suficiente consideración, lo cual hace que aparezcan numerosas contradicciones entre los estudios publicados.

Sox9 es uno de los primeros factores que se expresan en los pliegues neurales, y recientemente se ha descrito su capacidad de inducir la formación de cresta neural en el embrión de pollo (Cheung y Briscoe, 2003). Efectos similares se han observado para *FoxD3*, que también se expresa en la cresta premigratoria temprana, y que posteriormente participa en la especificación fenotípica reprimiendo la diferenciación de melanoblastos (Kos *et al.*, 2001; Dottori *et al.*, 2001). Miembros de la familia *Snail*, *Slug* en pollo y *Snail* en ratón, también se expresan en la

cresta neural premigratoria e inducen la transición epitelio-mesénquima (revisado en Nieto, 2002). También *Sox10* se expresa en la cresta neural, aunque con bastante posterioridad a todos los anteriores, y se ha relacionado con el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células de cresta a bajas concentraciones, y con la inhibición de la diferenciación neuronal en dosis más altas, favoreciendo la generación de glía periférica y melanoblastos (Kim *et al.*, 2003; Paratore *et al.*, 2001).

Genes homeobox de la clase MSH, como *Msx1* y *Msx2*, se expresan igualmente en los precursores de la cresta neural, y se ha visto que ratones mutantes para *Msx1* presentan numerosas deficiencias en los derivados de la cresta neural (Foerst-Potts y Sadler, 1997). *Id2*, un factor de transcripción del tipo bHLH, se expresa de un modo específico en los pliegues neurales que darán lugar a la cresta neural cefálica, y se ha visto que también es capaz de inducir la formación de cresta neural (Martinsen y Bronner-Fraser, 1998).

2. 1. 2. Transición Epitelio-Mesénquima

Una vez que el tubo neural se cierra, o incluso antes de ello en mamíferos, las células de cresta neural sufren una serie de transformaciones por las que pierden sus características epiteliales y se transforman en células mesenquimáticas, lo que les permite abandonar el tubo neural y comenzar la migración. Este proceso es conocido con el nombre de transición epitelio-mesénquima (TEM) (Boyer *et al.*, 2000). La TEM incluye la reestructuración del citoesqueleto, variaciones en la expresión de moléculas de superficie y de matriz extracelular, y la secreción de metaloproteasas capaces de degradar la lámina basal del tubo neural para permitir la salida de las células (Erickson, 1987; Raible *et al.*, 1992; Duong y Erickson, 2004).

Uno de los factores que podrían estar controlando la reestructuración del citoesqueleto es RhoB, un miembro de la familia rho de pequeñas GTPasas, cuya expresión ha sido descrita en la cresta neural, tanto en la

premigratoria como en la migratoria temprana (Liu y Jessell, 1998). La familia rho pertenece a su vez a la superfamilia ras, compuesta por los grupos rho, rac y cdc42, y cuyos miembros se ha visto que juegan papeles importantes en procesos de adhesión, morfología y motilidad, así como en la progresión del ciclo celular (Hall, 1998; Ridley y Hall, 1992). Se ha visto que *RhoB* puede inducirse en explantes de tubo neural mediante la adición de BMP4, y que dicha inducción es posterior a la de *Slug* (Liu y Jessell, 1998). De hecho, la expresión ectópica de *Slug* en el tubo neural de embriones de pollo induce una extensión del dominio dorsal de expresión de *RhoB*, así como un mayor número de células de cresta neural migrantes que muestran expresión de *RhoB* (del Barrio y Nieto, 2002). Además, el bloqueo específico de la actividad de RhoB por medio de la exotoxina C3, que inhibe la acción de las proteínas rho sin afectar a los otros miembros de la familia, impide la delaminación de las células de cresta neural in vitro, pero no afecta ni a la especificación ni a la migración de la cresta neural ya delaminada (Liu y Jessell, 1998).

Experimentos adicionales han mostrado que, en la región troncal del tubo neural de embriones de pollo, la inhibición de la señalización de BMP por medio de la implantación de células que expresan noggin produce un bloqueo de la delaminación de la cresta neural, concomitante con una reducción de la expresión de *RhoB* y *cadherina-6b* en la región dorsal, aunque *Slug* permanece inalterado (Sela-Donenfeld y Kalcheim, 1999). La falta de efecto sobre los niveles de *Slug* podría deberse a los mecanismos diferenciales de generación de cresta descritos entre el tronco y la cabeza, o por que la función de las BMPs no es requerida para el mantenimiento de la expresión de *Slug*.

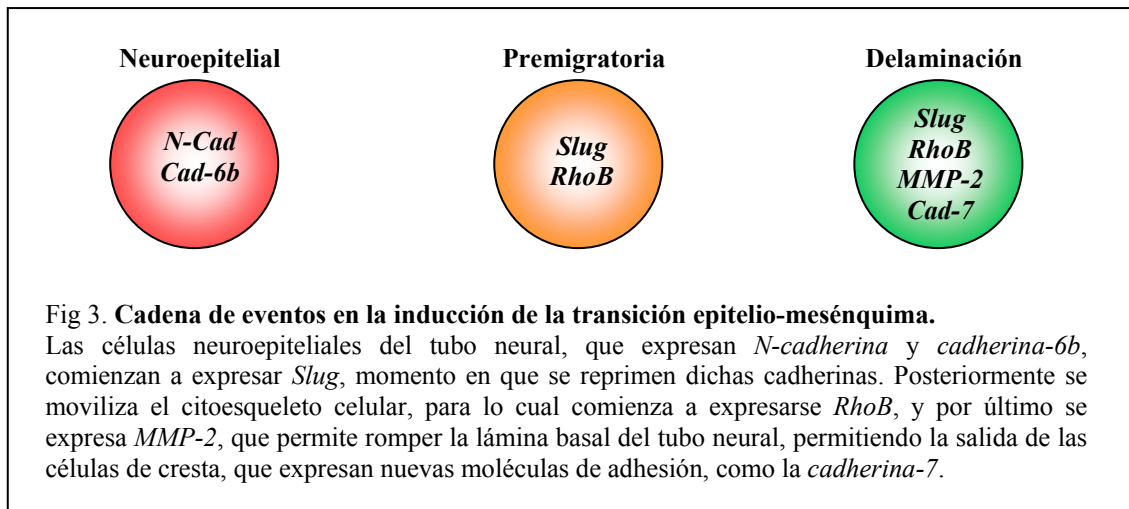
Otro paso importante en el proceso de delaminación es la variación en los factores de adhesión que expresan las células. Así, se ha demostrado que las células de cresta neural premigratoria expresan N-cadherina y cadherina-6b, y que durante la TEM, dichas moléculas desaparecen, para ser sustituidas por la cadherina-7 (Nakagawa y Takeichi, 1995). Las cadherinas son proteínas transmembrana que actúan como moléculas de adhesión dependientes de Ca^{2+} , interaccionan preferentemente de un modo

homofílico, y son esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural de los epitelios. De este modo, la desaparición de un subtipo de cadherina de la superficie de la célula favorece la segregación de dicha célula de su entorno. En el contexto concreto de la delaminación de la cresta neural, la desaparición de la cadherina-6b y la N-cadherina de las células que van a abandonar el tubo, y aparición de la cadherina-7, facilita su segregación del entorno del tubo neural dorsal. Experimentos de sobreexpresión de N-cadherina y cadherina-6b en el tubo dorsal de embriones de pollo producen un bloqueo parcial de la salida de cresta neural, lo que parece apoyar este modelo (Nakagawa y Takeichi, 1998).

Muy posiblemente la regulación de la expresión de estas cadherinas está mediada por los factores de la familia Snail. Su papel en dicho proceso ha sido ampliamente demostrado, no sólo en la cresta neural de pollo y *Xenopus* (Nieto *et al.*, 1994; del Barrio y Nieto, 2002; LaBonne y Bronner-Fraser, 2000), sino también en los procesos de invasión tumoral, donde se ha visto que reprime la expresión de la *cadherina-E* (Cano *et al.*, 2000; Batlle *et al.*, 2000). En el mismo sentido, los ratones que expresan formas dominantes negativas de Snail mueren durante la gastrulación, debido a que las células del epiblasto no son capaces de transformarse en mesodermo funcional, un proceso que discurre a través de una TEM en circunstancias normales, y que en estos embriones se encuentra bloqueada (Carver *et al.*, 2001). Por lo tanto, los genes de la familia Snail, y concretamente *Slug* en el pollo, son unos buenos candidatos para mediar el control de la represión de cadherinas específicas del tubo neural, permitiendo la salida de la cresta neural durante el proceso de delaminación.

Por último, es necesaria también la mediación de las metaloproteasas, que son unas proteínas secretadas capaces de degradar una gran variedad de factores de matriz extracelular, como la laminina y varios tipos de colágenos. Su expresión en las células de cresta provoca la rotura de la lámina basal que rodea el tubo neural, y permite su salida. Un ejemplo es la metaloproteasa MMP-2, la cual se expresa en la cresta neural del pollo, y cuya inhibición por medio de morfolinis antisentido *in vivo*, o

mediante inhibidores de metaloproteasas in vitro, produce un bloqueo de la salida de cresta neural (Duong y Erickson, 2004).



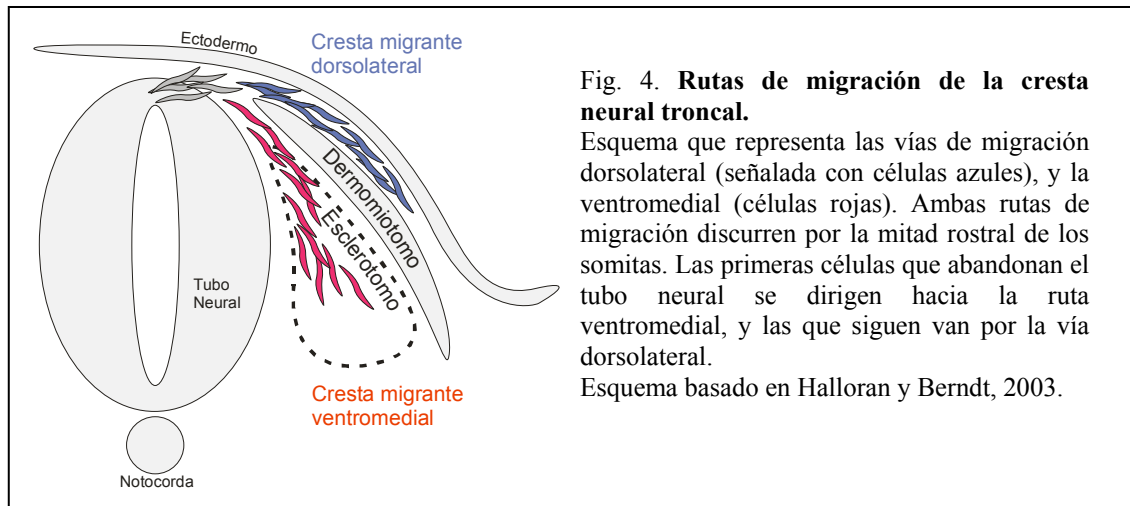
2. 1. 3. Migración y derivados de la cresta neural

Una vez que las células de cresta neural han abandonado el tubo, comienzan a migrar a través del mesénquima adyacente, y lo hacen agrupándose en corrientes bien definidas y específicas según la posición en la que las células hayan sido generadas. Son muchos los experimentos que demuestran que una correcta migración de la cresta es necesaria para la morfogénesis general del embrión.

2. 1. 3. 1. Migración y derivados de la cresta neural troncal

La cresta neural troncal sigue rutas más sencillas, definidas principalmente por los somitas, los cuales poseen una mitad rostral permisiva a la migración, y otra mitad caudal que la impide, facilitando así la segmentación de la cresta (Rickmann *et al.*, 1985). Estas vías se dividen además en dos corrientes bien definidas: las células que abandonan el tubo neural en primer lugar siguen un camino ventromedial, a través de la mitad anterior del esclerotomo, de tal modo que las que más distancia alcanzan dan lugar posteriormente a los ganglios simpáticos, mientras que las que

migran menor distancia forman los ganglios de la raíz dorsal (DRGs). Posteriormente, las células que abandonan el tubo neural toman una vía dorsolateral, entre el ectodermo y el dermomiótomo subyacente, y dan lugar a melanocitos (Fig. 4; Halloran y Berndt, 2003; Weston y Butler, 1966; Serbedzija *et al.*, 1990; Erickson *et al.*, 1992).



Los mecanismos moleculares que median la migración de la cresta neural troncal incluyen factores de matriz extracelular, así como ligandos y receptores de la familia Eph (revisado en Halloran y Berndt, 2003). Los componentes de matriz extracelular (CME) pueden ser permisivos o inhibitorios para la migración. La mayor parte de los estudios sobre los CME permisivos se han realizado in vitro y, por ejemplo, se ha demostrado que la fibronectina, la laminina y los colágenos de tipo I, IV y VI se unen a la integrina- $\beta 1$, que se expresa en las células de la cresta (Thiery *et al.*, 1982; Perris *et al.*, 1993a, b; Lallier *et al.*, 1992, 1994). Sin embargo, no se ha podido encontrar ninguno de estos factores expresados de un modo diferencial en los somitas. Por el contrario, sí se han encontrado varios factores repelentes de la migración que se expresan diferencialmente en la mitad caudal de los somitas. Un ejemplo son los proteoglicanos de distintos tipos, que se ha visto que se expresan en la mitad caudal del esclerótomo, posiblemente impidiendo la entrada de las células de cresta en dicho dominio (Oakley *et al.*, 1994). Entre estos proteoglicanos están el CTB-proteoglicano, el agrecano, el versican y el colágeno de tipo IX (Landolt *et al.*, 1995; Perris *et al.*, 1996; Ring *et al.*, 1996).

Otras moléculas con un papel fundamental en la guía de la migración de la cresta neural son las de la familia Eph, constituídas por las ephrinas y sus receptores tirosina kinasa Eph (Mellitzer *et al.*, 2000). Las ephrinas son ligandos de membrana, y las hay dos clases: las ephrinas A, unidas a la membrana a través de un grupo GPI (Glucosilphosphatidilinositol, un grupo que se une covalentemente al extremo C-terminal de algunas proteínas y media su unión a la membrana celular) son reconocidas por los receptores EphA; y las ephrinas B, que son proteínas integrales de membrana y se unen a los receptores de tipo EphB. Los ligandos de una clase son reconocidos por los receptores de la misma clase indistintamente, salvo el receptor EphA4, que es el único capaz de reconocer ligandos de ambos tipos. Se ha demostrado que diversos componentes de estas familias se expresan en poblaciones específicas de células de cresta neural, así como en regiones concretas a lo largo de sus vías de migración. Así, por ejemplo, la ephrina-B1 se expresa en la mitad caudal del esclerotomo, y se ha demostrado que repele la migración de cresta neural *in vitro* (Fig. 5; Wang y Anderson, 1997).

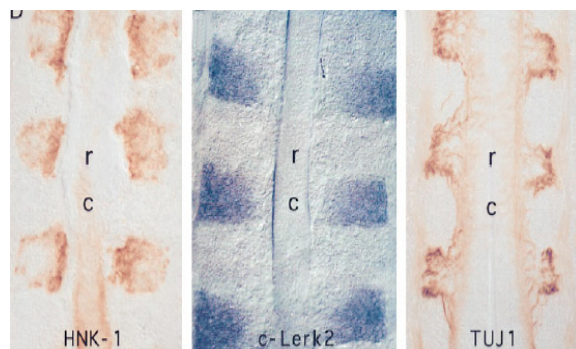


Fig. 5. Expresión diferencial de moléculas señalizadoras en los somitas. La migración de cresta neural, detectada con la tinción de HNK-1, transcurre por la mitad rostral (r) de los somitas, por donde también pasan los axones motores, marcados con Tuj1, evitando la mitad caudal (c) de los somitas, en la que se expresa c-Lerk2 (ephrina-B1). Fotografías tomadas de Wang y Anderson, 1997.

Además, las células de cresta neural troncal expresan *EphA2*, *EphA4* y *EphA5*, y la sobre-expresión de cualquiera de ellos hace que las células de cresta migren tanto por la parte rostral como por la caudal de los somitas (McLennan y Krull, 2002). También se ha comprobado que las interacciones entre ligandos y receptores Eph de tipo B juegan un papel importante en la

elección entre las vías dorsolateral y ventromedial de migración de las células de cresta neural (Santiago y Erickson, 2002).

Por último, la participación de las semaforinas en la señalización que es necesaria para la migración de la cresta neural también ha sido descrita recientemente. La Sema3A se expresa a lo largo de las vías de migración de cresta tanto en el tronco como en la cabeza, y parte de su complejo receptor, la neuropilina-1, se expresa en las células de cresta migrantes, y parece que se encargan de evitar que las células migren a sitios incorrectos. Esto se ha visto confirmado por estudios realizados en ratones *knock-out* para ambas moléculas (Eickholt *et al.*, 1999; Kawasaki *et al.*, 2002).

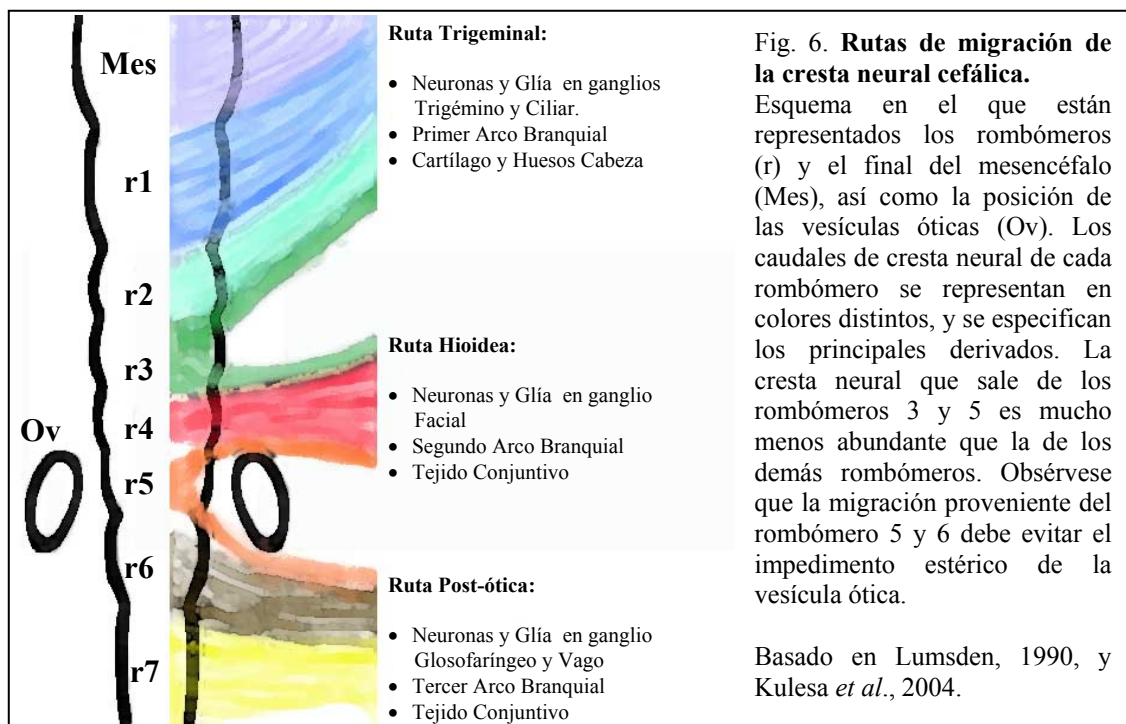
2. 1. 3. 2. Migración y derivados de la cresta neural cefálica

La cresta neural cefálica comienza a migrar de la región del mesencéfalo en estadio HH8⁺, y posteriormente lo hace a partir de los distintos segmentos del romboencéfalo. Las rutas de migración de estas células son mucho más complejas y heterogéneas que las de la cresta troncal. Cada rombómero produce cresta neural que por una vía característica. Los rombómeros 3 y 5 generan un número mucho menor de células, que además migran a lo largo de las vías que surgen de los rombómeros adyacentes. La cresta craneal da lugar a la mayor parte de los huesos, los cartílagos y el tejido conectivo de la cabeza, así como a las neuronas y la glía del sistema nervioso periférico (ganglios sensoriales, simpáticos, parasimpáticos y células de Schwann), y a todas las células pigmentadas (a excepción de las células del epitelio pigmentario de la retina).

Hay tres rutas de migración fundamentales a partir del mesencéfalo y el rombencéfalo, denominadas de rostral a caudal, trigeminal, hioidea y post-ótica (Fig. 6):

La primera vía de cresta neural, denominada trigeminal, surge del mesencéfalo y de los rombómeros 1 y 2 principalmente, aunque el

rombómero 3 aporta también un pequeño número de células. Las células que salen de dichos rombómeros migran rostralmente, uniéndose al flujo de cresta que proviene del mesencéfalo, y también ventrolateralmente, para poblar el primer arco branquial. Esta cresta da lugar, entre otros tipos celulares, a las neuronas sensoriales y la glía de los ganglios trigémino y ciliar, así como a los componentes de las prominencias orofaciales y a los derivados del primer arco branquial, que forman los huesos de la mandíbula (Fig. 6; Lumsden *et al.*, 1991; Köntges y Lumsden, 1996; Lee *et al.*, 2003).



La segunda vía de migración, llamada hioidea, está formada en gran parte por la cresta que se genera en el rombómero 4, que se mueve hacia el segundo arco branquial. Células de los rombómeros adyacentes se unen a esta vía principal, para lo cual migran caudalmente en el caso de parte de las células producidas en el rombómero 3, o rostralmente para una población de las células que salen del rombómero 5. Estas células dan lugar al esqueleto hioideo, así como a neuronas y glía del ganglio facial proximal, y glía del ganglio facial distal (geniculado) (Fig. 6).

Por último, la vía post-ótica de migración se compone en su mayoría de células de los rombómeros 6 y 7, que se desplazan hacia el tercer arco

branquial, así como de una población de células que parten del rombómero 5 y se mueven caudalmente para unirse al grueso de dicha vía de migración. Las células de cresta que siguen esta ruta forman neuronas y glía de los ganglios glosofaríngeo y vago proximales (ganglios superior y yugular, respectivamente), así como la glía de la parte distal de dichos ganglios (ganglios petroso y nodoso, respectivamente) (Fig. 6).

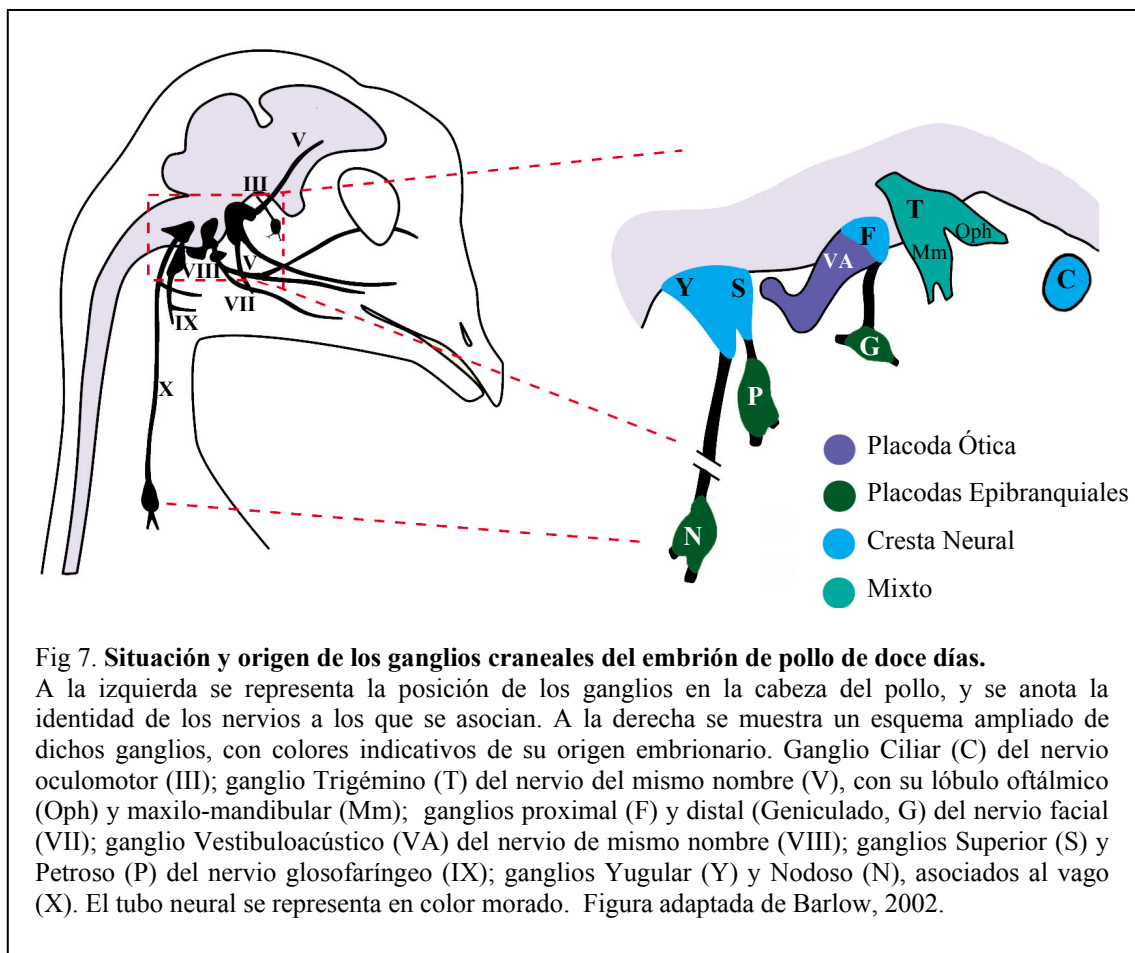
En cuanto a los mecanismos moleculares encargados de guiar a las células de la cresta craneal a lo largo de sus vías de migración, muchos de ellos son similares a los descritos para la cresta troncal, e incluyen factores de matriz extracelular, moléculas de la familia de los Eph, y semaforinas. La mayor parte de los estudios se han hecho en *Xenopus* y ratón, de modo que está por definir el alcance de las interpretaciones extrapoladas al embrión de pollo. En *Xenopus*, los receptores EphA4 y EphB1 se expresan en células de la cresta neural que migran hacia el tercer y cuarto arco branquial, mientras que en las que migran hacia el segundo arco branquial se expresa el ligando ephrina-B2. La interrupción de estas señales hace que la cresta se desvíe hacia arcos branquiales incorrectos (Smith *et al.*, 1997). El papel de las moléculas Eph en el desarrollo de la cresta neural de ratón también ha sido estudiado, con conclusiones muy similares (Adams *et al.*, 2001).

Con respecto a las semaforinas, hay también estudios en la cresta neural craneal, esta vez en el pez cebra, que muestran que la expresión de la Sema3D en la vía de migración de la cresta neural intermedia impide que se entremezclen las células con aquellas de las corrientes adyacentes, observándose una desorganización de los arcos branquiales cuando se introducen morfolidos contra dicha molécula (Halloran *et al.*, 1999; Berndt *et al.*, 2002).

2. 2. LOS GANGLIOS CRANEALES

El sistema nervioso periférico consta de dos grandes divisiones claramente diferenciadas: el sistema nervioso autónomo (formado a su vez

por el sistema simpático y el parasimpático) y el sistema nervioso somático. Este último está formado por una serie de neuronas sensoriales, generalmente bipolares, que inervan piel, músculos y articulaciones, cuyos cuerpos celulares se agrupan en ganglios que, en número par, se alinean a ambos lados del sistema nervioso central. Mientras que en el tronco constituyen los llamados ganglios de las raíces dorsales (DRG de *dorsal root ganglia*), en la cabeza estos ganglios se asocian a los grandes nervios craneales (pares craneales) de fibras motoras. En la figura 7 se representan los ganglios sensoriales craneales junto con el ganglio ciliar. Este ganglio, asociado al tercer par craneal (oculomotor), está formado casi exclusivamente por neuronas parasimpáticas.



A pesar de que los primeros estudios morfológicos sobre los ganglios craneales se remontan a hace aproximadamente un siglo y medio, con los trabajos pioneros de His (1868), el origen embrionario de estas estructuras permaneció controvertida hasta casi un siglo después. Entonces diversos

estudios comenzaron a establecer la aportación relativa de la cresta neural y de las placodas ectodérmicas a su formación. Las placodas son unos engrosamientos del ectodermo que, al igual que la cresta neural, se inducen en el borde entre la placa neural y la epidermis, y dan lugar a células migratorias. De hecho, se ha postulado que ambas poblaciones de células, las de la cresta neural y las de las placodas, podrían haber evolucionado a partir de un mismo tipo celular ancestral (Northcutt y Gans, 1983; Baker y Bronner-Fraser, 1997). Para los primeros estudios de desarrollo se utilizó tanto el marcaje radiactivo de precursores como los transplantes heterólogos de células de embriones de codorniz en pollo (Hamburger, 1961; Johnston, 1966, D'Amico-Martel y Noden, 1980; Narayanan y Narayanan, 1980; Ayer-Le Lièvre y Le Douarin, 1982). Sólo recientemente se han comenzado a utilizar marcadores moleculares para el análisis de la ontogenia de estos ganglios (revisado en Le Douarin y Kalcheim, 1999).

Por regla general, las neuronas de cada ganglio tienen un único origen embrionario, ya sea éste la cresta neural o las placodas ectodérmicas. La excepción a esta regla la constituye el ganglio trigémino, que es mixto, con neuronas procedentes de ambos orígenes. En este ganglio, la subpoblación de neuronas de origen placodal comienza su diferenciación más temprano y lo hace en las regiones más distales de ambos lóbulos (oftálmico y maxilo-mandibular), mientras que la subpoblación de neuronas procedentes de la cresta neural comienza su diferenciación más tarde y en la región proximal. Uno de los primeros marcadores de la diferenciación neuronal es, al igual que en el sistema nervioso central, el factor de transcripción *Islet1*. También está descrito que las neuronas procedentes de la placoda expresan *Brn3a* (*Brn3.0*), y son con ello distinguibles de las que derivan de la cresta neural, las cuales en su mayor parte no lo hacen (Artinger *et al.*, 1998), aunque otros autores relacionan la expresión de *Brn3a* con estadios de maduración sucesivos de los neuroblastos, y no con su origen embrionario (Fedtsova *et al.*, 2003). La primera condensación del ganglio trigémino se produce a partir de células de cresta neural, que son posteriormente acompañadas por las que derivan de las placodas (Covell y Noden, 1989). Sin embargo, se ha demostrado que las células de la cresta no son necesarias para la formación de la

placoda del trigémino (Stark *et al.*, 1997), ni tampoco para la correcta proyección de los axones de las neuronas derivadas de la misma (Hamburger, 1961). La ablación de la cresta neural produce una mayor dispersión de las neuronas derivadas de la placoda, por lo que probablemente las células de cresta funcionan como un centro de agregación del trigémino. Por el contrario, las neuronas derivadas de la placoda sí son esenciales para la correcta formación de proyecciones de las neuronas derivadas de la cresta neural (Hamburger, 1961).

Las neuronas del ganglio ciliar derivan casi por completo de la cresta neural mesencefálica y del romboencéfalo anterior. Aunque se creía que la totalidad de las neuronas presentes en el ganglio ciliar provenían de la cresta neural, las últimas observaciones muestran que hay un pequeño aporte de neuronas procedentes de una placoda hasta hace poco no descrita, situada junto a la placoda del trigémino, si bien en el número de estas neuronas es muy pequeño y se desconoce su función (Lee *et al.*, 2003). En los otros casos, las neuronas de los ganglios proximales tienen generalmente su origen en la cresta neural, mientras que las de los distales provienen de las placodas.

En todos los casos, la glía periférica y las células de Schwann que envuelven a los nervios a la entrada y la salida de los ganglios provienen exclusivamente de la cresta neural.

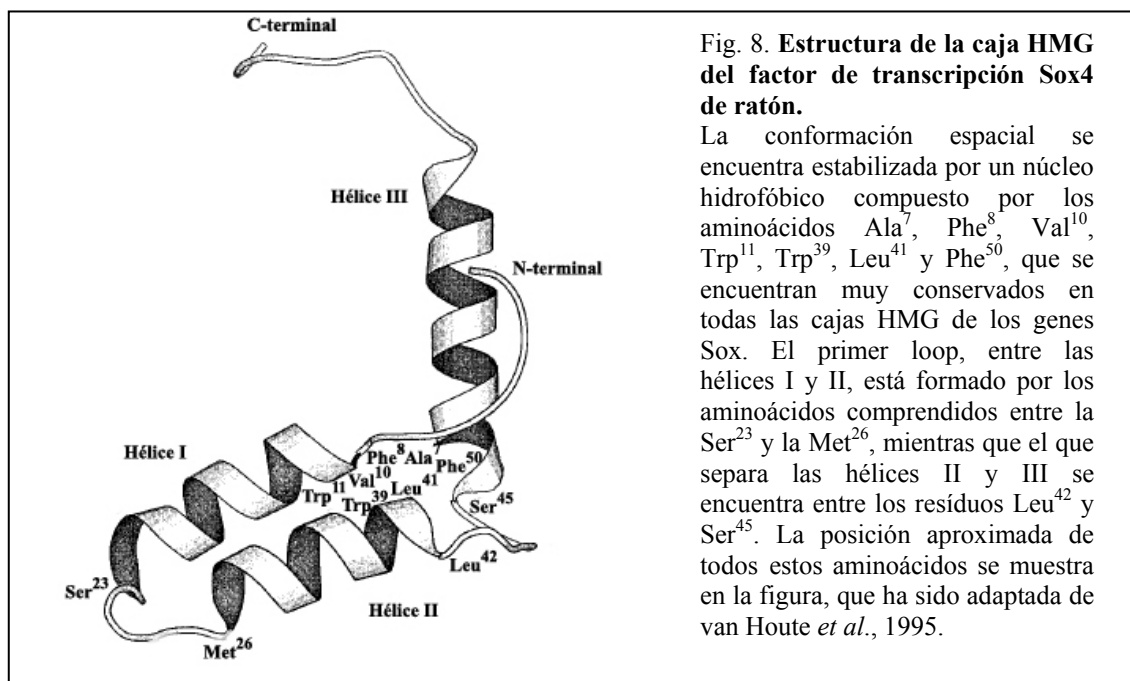
2. 3. LA FAMILIA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SOX

Desde el descubrimiento de Sry (Gubbay *et al.*, 1990), el factor de transcripción que inicia el proceso de diferenciación sexual en los machos de los mamíferos, y basándose en la homología con el dominio de unión al DNA (caja HMG), numerosos factores de transcripción han sido caracterizados y agrupados bajo el nombre de la familia Sox (***Sry-related HMG box***). Estas proteínas están implicadas en una gran variedad de procesos en el desarrollo, lo que hace a la familia Sox una de las más prolíficas en su

clase, dado que hasta el momento ya han sido descritos más de 30 miembros en vertebrados.

2. 3. 1. La caja HMG

El dominio HMG (de *high mobility group*) de los factores Sox se encuentra muy conservado, y su función es mediar la unión de los mismos al DNA, de un modo específico a la secuencia consenso 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' (Laudet *et al.*, 1993). La caja HMG consta de unos 79 aminoácidos organizados en tres α -hélices (I-III), que se disponen en forma de L, de tal modo que las hélices I y II forman el brazo largo de la L, mientras que la hélice III y su extensión N-terminal forman el brazo corto (Fig. 8; van Houte *et al.*, 1995). Esta estructura se encuentra estabilizada por medio de la presencia de un núcleo hidrofóbico, cuyos aminoácidos están tan conservados como aquellos que forman la región de contacto con el DNA.



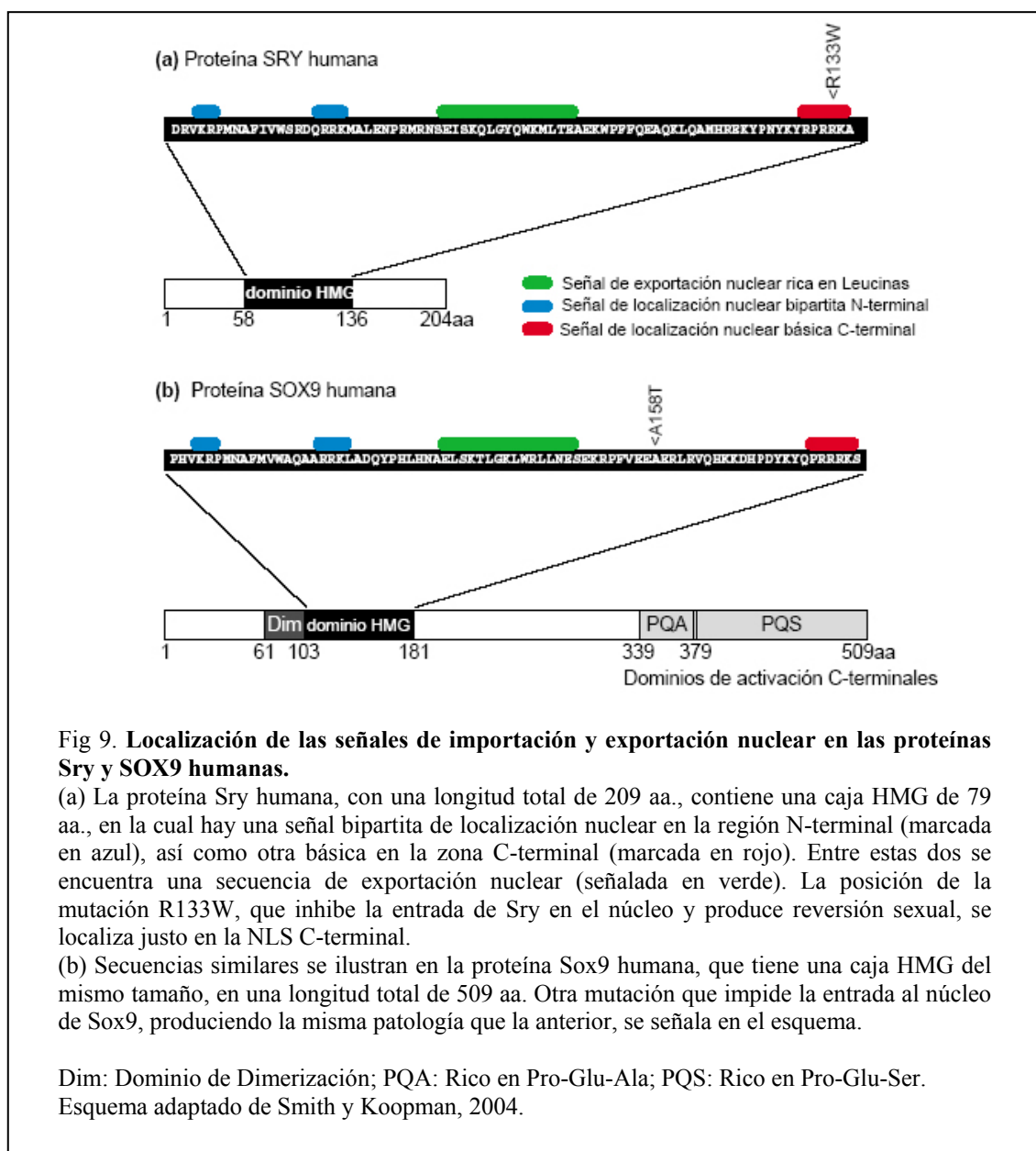
Al contrario de lo que sucede con la mayoría de los factores de transcripción, que se ligan al surco mayor de la doble hélice, la caja HMG se une al surco menor y produce una torsión característica de unos 70-85° en

la cadena de DNA, mientras que la conformación espacial de la caja HMG permanece inalterada. Este tipo de unión tan peculiar ha llevado a hipotetizar que las proteínas Sox puedan realizar parte de su función como organizadoras de la estructura local de cromatina, generando una conformación espacial del DNA que permita la agregación de otros factores para formar complejos multiproteicos biológicamente activos. Un ejemplo bien estudiado es el caso de la cooperación de los factores Sox9, LSox5 y Sox6 para la activación del gen *Col2a1* durante el proceso de condrogénesis (Werner y Burley, 1997; Lefebvre *et al.*, 1998).

La conservación de todas estas peculiaridades funcionales hacen que la secuencia aminoacídica de la caja HMG permita muy pocos cambios. Así, por ejemplo, la secuencia "RPMNAF" se encuentra conservada en todas las cajas HMG de la familia Sox descritas hasta el momento, así como en el factor Sry (Bowles *et al.*, 2000). De hecho, una mutación puntual del factor Sry, que cambia la metionina de dicha secuencia por una isoleucina (M64I), produce una reducción de unos 13° del ángulo de torsión inducido en el DNA por dicho factor. Este cambio desencadena una pérdida de su actividad biológica, que lleva a la aparición de un síndrome caracterizado por una reversión sexual (Murphy *et al.*, 2001). La misma patología aparece con la pérdida de la capacidad de unión al DNA que se produce en la mutación puntual N65H de Sry (Assumpcao *et al.*, 2002). En general, entre un 10 y un 15% de las mutaciones que producen este síndrome están localizadas en el factor Sry, y afectan tanto a la capacidad de unión del mismo al DNA como al ángulo de torsión que genera.

Recientemente, se han descrito casos de pacientes con el mismo síndrome que tienen otra mutación en el factor Sry (R133W), y que curiosamente afecta a la localización nuclear de dicho factor (Li *et al.*, 2001). El síndrome de reversión sexual también se puede producir por otra mutación puntual en la caja HMG del factor Sox9 -A158T- (Preiss *et al.*, 2001). El estudio de estas mutaciones ha llevado a la identificación de varias secuencias de importación y exportación nuclear dentro de la caja HMG. En Sox9, por ejemplo, se encontró una secuencia de exportación nuclear rica en leucinas (NES) (Fig. 9), situada entre dos secuencias de

importación nuclear (NLS), una bipartita situada en el extremo N-terminal de la caja HMG, y otra con una mayoría de residuos básicos situada en la zona C-terminal de la caja HMG. La adición de leptomicina B, que inhibe específicamente el factor CRM1 encargado de extraer del núcleo las proteínas con secuencia NES, a cultivos organotípicos de gónadas XX de ratón, indujo una reversión sexual en las mismas, debido a la presencia persistente de Sox9 en el núcleo (Gasca *et al.*, 2002; Smith y Koopman, 2004).



El requerimiento de un mecanismo similar para la función de Sox10, perteneciente al mismo subgrupo que Sox9, y en el que también están presentes estas señales de importación y exportación nuclear, ha sido también demostrado recientemente (Rehberg *et al.*, 2002). Por lo tanto, y dada la gran homología que hay entre las cajas HMG de los distintos genes Sox, es muy probable que la dinámica de exportación e importación nuclear, posiblemente controlada por la fosforilación y defosforilación de las secuencias NES y NLS, sea un importante mecanismo de regulación post-transcripcional de la actividad de dichos factores.

2. 3. 2. Análisis filogenético y estructural de la familia Sox

El análisis filogenético de las secuencias de las cajas HMG de las proteínas Sox, permite agrupar a los factores de esta familia en once grupos provisionales (Fig. 10; Bowles *et al.*, 2000). Se da la circunstancia de que los factores incluidos en cada grupo comparten además características estructurales y dominios funcionales.

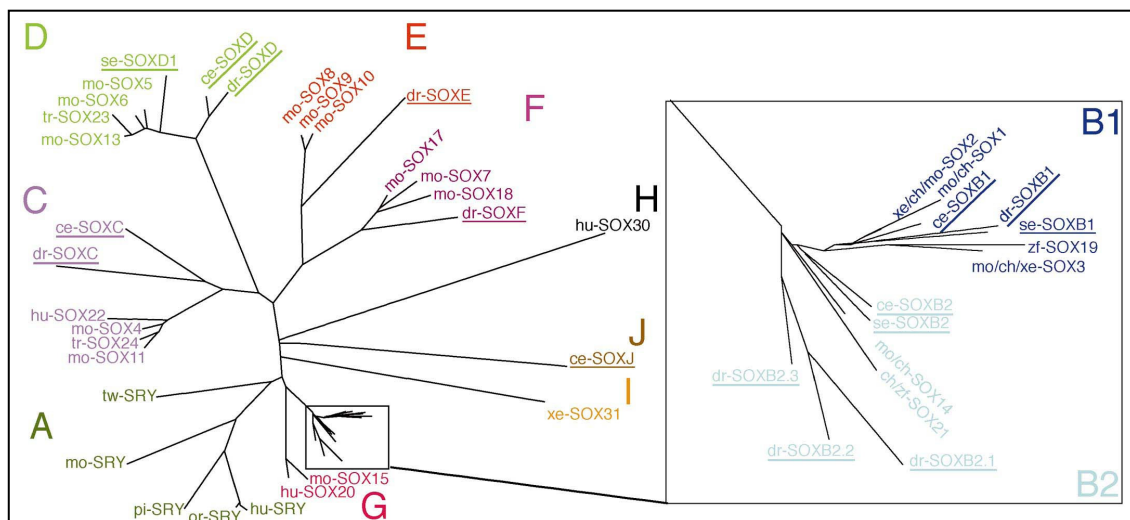


Fig. 10. Filogenia del dominio HMG de los factores Sox.

La longitud de las ramas es proporcional al grado de divergencia, obtenida usando el método FITCH (CGG). Para los grupos con más de un ortólogo de mamíferos de algún factor Sox, sólo se incluye un miembro representativo. Los distintos grupos se representan usando colores distintos, y los factores de invertebrados están subrayados.

Gráfico extraído de Bowles *et al.*, 2000.

En *Drosophila* y en el pez cebra se han encontrado duplicados de varios genes, como *Sox11* y *Sox9* (Rimini *et al.*, 1999), y parece que la duplicación de estos genes podría ser un fenómeno que se ha producido durante la evolución en diversas especies. Ésta podría ser una causa de la gran similitud entre algunos de estos factores, así como de la redundancia funcional que se observa entre muchos de ellos. Esto se observa, por ejemplo, en los miembros del grupo B1, todos ellos implicados en la determinación neuronal en el sistema nervioso central (Collignon *et al.*, 1996; Kamachi *et al.*, 1998). Del mismo modo, los factores del grupo D *Sox5* y *Sox6* están implicados en la espermatogénesis y en la condrogénesis, y también pueden ser sustituidos el uno por el otro, al menos in vitro (Lefebvre *et al.*, 1998).

Los miembros de un mismo grupo también suelen tener una estructura genómica similar, en lo que respecta al número y a la posición de los intrones. Así, los genes de los grupos A, B y C carecen de intrones (salvo en *C. elegans* y *Drosophila*), mientras que los genes de los grupos E y F tienen 2 ó 3 exones, y los del grupo D contienen el mayor número de exones, de 13 a 17, dependiendo de la especie (Schepers *et al.*, 2002). En este último grupo, el mayor número de exones va acompañado además de un procesamiento complejo del RNA primario que genera mayor diversidad de isoformas. Este proceso está finamente regulado y, por ejemplo en el caso de *Sox5* en el ratón, hay una forma corta (392 aa.) que se expresa únicamente en los testículos del animal adulto, mientras que varias formas más largas (763 y 728 aa.) se expresan durante el desarrollo embrionario (Denny *et al.*, 1992; Lefebvre *et al.*, 1998; Hiraoka *et al.*, 1998).

En cuanto a la estructura de la proteína, los miembros de un mismo grupo suelen compartir un conjunto de dominios estructurales con una distribución característica, siendo la posición de la caja HMG y la longitud total de la proteína las peculiaridades más conservadas normalmente (Fig. 11; Bowles *et al.*, 2000;).

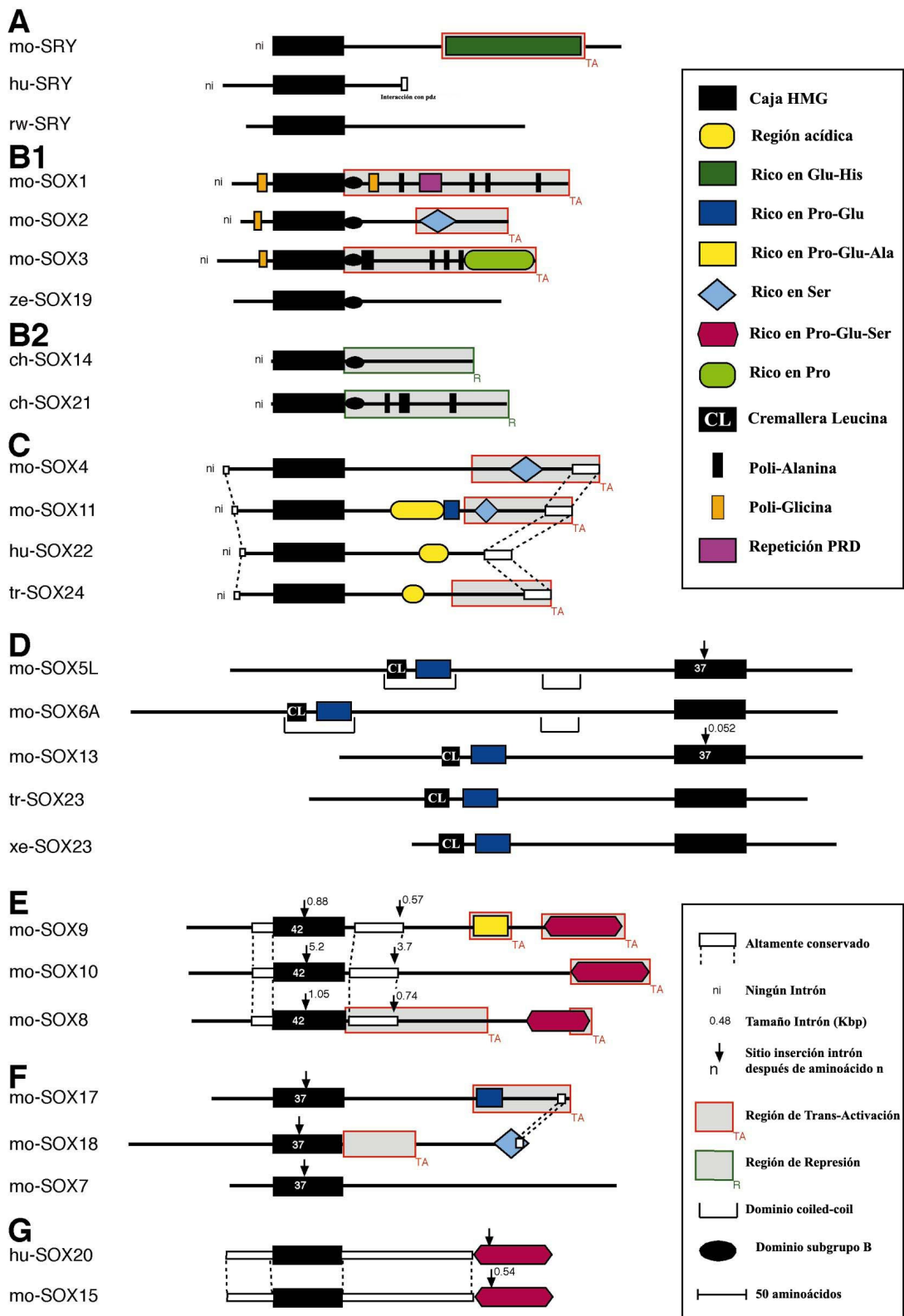


Fig. 11. Estructura de los subgrupos de la familia Sox.

Representación esquemática de la estructura de las proteínas Sox, en la que se detallan las características más representativas de cada grupo. Varios dominios estructurales y regiones funcionales conocidas, así como la posición y longitud de los intrones conocidos. Adaptado de Bowles *et al.*, 2000.

En los factores del grupo E se han descrito una o más regiones de transactivación. Hay amplias zonas con una alta similitud, además de regiones ricas en prolinas, glutaminas y serinas. Estas últimas regiones hacen a estos factores potencialmente regulables por fosforilación. Se ha demostrado que, al menos en Sox9, éste es un importante mecanismo de regulación, dado que su fosforilación por la PKA aumenta significativamente su capacidad de unión al DNA e incrementa su potencial de transactivación del gen *Col2a1* (Huang *et al.*, 2000).

En cuanto al grupo D, se observa en todos sus integrantes que, al contrario que en las proteínas de los demás grupos, la caja HMG se encuentra en la región C-terminal. Hasta ahora no han sido descritos dominios de transactivación. Todos muestran secuencias compatibles con la interacción con otras proteínas a través de la formación de "cremalleras de leucina", y se ha demostrado que ésta es capaz de mediar la homodimerización y heterodimerización de Sox6 y LSox5 (Hiraoka *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 1998). La presencia de una región rica en glutaminas contigua a la secuencia de aminoácidos que median la formación de la cremallera de leucina, impide que se cree una nueva zona de unión al DNA cuando estos factores dimerizan, al contrario de lo que sucede en las proteínas bZIP.

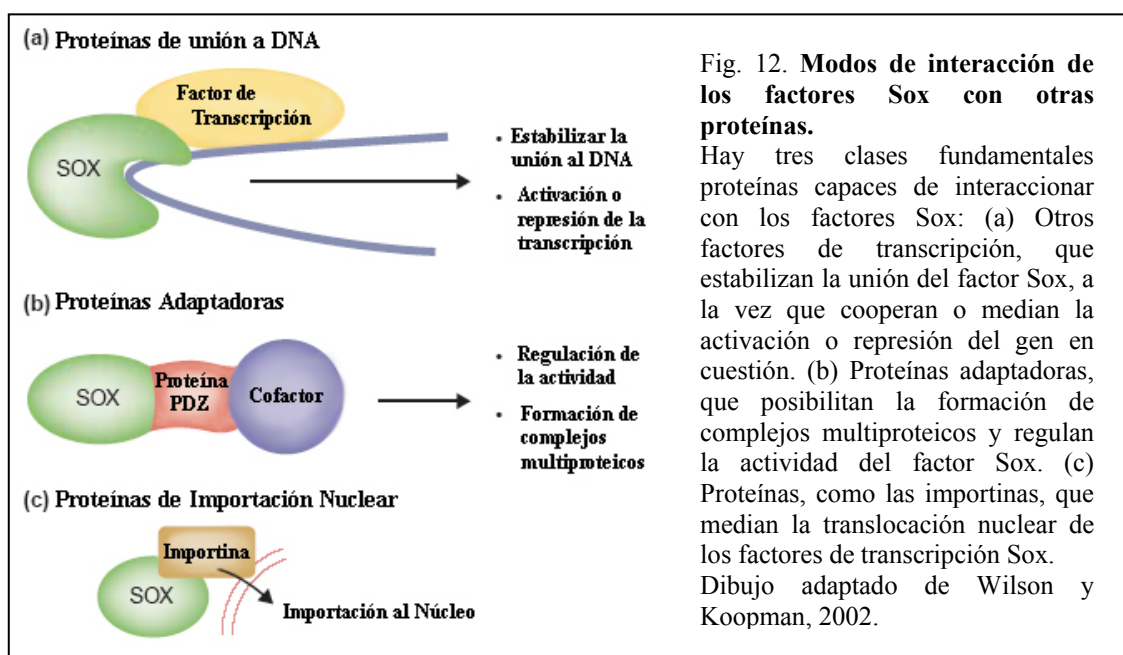


Fig. 12. **Modos de interacción de los factores Sox con otras proteínas.**

Hay tres clases fundamentales de proteínas capaces de interactuar con los factores Sox: (a) Otros factores de transcripción, que estabilizan la unión del factor Sox, a la vez que cooperan o median la activación o represión del gen en cuestión. (b) Proteínas adaptadoras, que posibilitan la formación de complejos multiproteicos y regulan la actividad del factor Sox. (c) Proteínas, como las importinas, que median la translocación nuclear de los factores de transcripción Sox. Dibujo adaptado de Wilson y Koopman, 2002.

Estas regiones no sólo son capaces de producir interacciones con los miembros de un mismo grupo, sino que también permiten la interacción con otras proteínas y, de hecho, en los últimos años se han aislado numerosos factores que interaccionan con las proteínas Sox, y que incluyen proteínas adaptadoras, otros factores de transcripción y proteínas de importación al núcleo (Fig. 12; Wilson y Koopman, 2002; Kamachi *et al.*, 2000).

Dada la baja afinidad que muestran casi todos los factores Sox en su unión al DNA, la interacción con otros factores se ha propuesto como un mecanismo de estabilización generalizado. Además, es frecuente que un mismo factor Sox se exprese en distintos tejidos y que realice funciones diferentes en cada uno. Como las cajas HMG de estos factores son en cierto grado intercambiables (Bergstrom *et al.*, 2000), no parece que la afinidad por un sitio concreto del DNA sea una característica determinante, sino que la interacción con factores específicos presentes en cada situación es probablemente un elemento más decisivo para su mecanismo de acción. El modelo predominante sugiere que la especificidad se genera por la interacción de los factores Sox con otros factores coexpresados en un mismo tipo celular. La caja HMG, además de mediar la unión al DNA, contiene también regiones de interacción con otras proteínas. Esto permite el acoplamiento inicial de los factores Sox a otros factores de transcripción cuyos sitios de unión al promotor se hallen situados en la proximidad. Posteriormente, esta interacción se estabiliza por medio de otras regiones de la proteína situadas fuera del dominio HMG. Así, se ha visto que aunque Pax6 y Sox2 son capaces de unirse *in vitro* de un modo independiente al activador DC5 del promotor del gen codificante de la δ -cristalina, la estabilidad de dicha unión *in vivo*, y por tanto la capacidad de activar la transcripción de este gen, requiere de la formación de un complejo proteico entre ambos factores (Kamachi *et al.*, 2001).

2. 3. 3. Los genes sox en el desarrollo embrionario

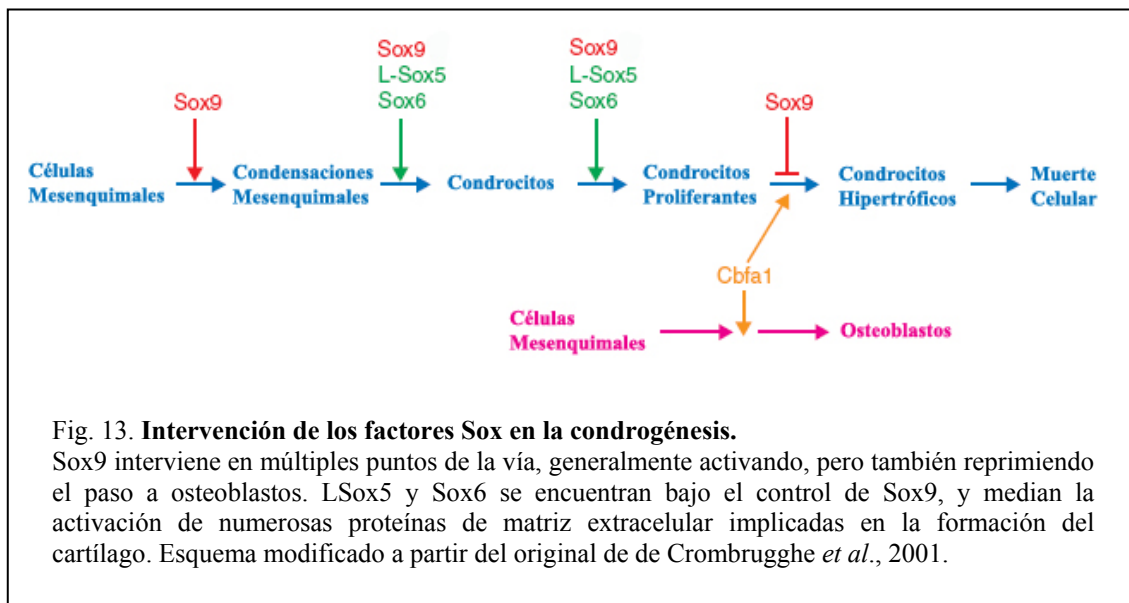
Dado el gran número de proteínas Sox que se han descrito hasta el momento, no resulta extraño que la mayor parte de los tejidos y tipos

celulares expresen al menos un factor Sox durante alguna etapa de su desarrollo. En efecto, varios estudios muestran que algunos tejidos expresan más de un factor Sox en un momento determinado, y dada la similitud de las secuencias de DNA que reconocen, es posible que algunas veces funcionen de un modo redundante o que otras su coexpresión afecte mutuamente a su actividad (Uwanogho *et al.*, 1995; Stock *et al.*, 1996; Lefebvre *et al.*, 1998). Es más, la redundancia funcional es un tema recurrente entre muchas proteínas Sox, y representa una dificultad adicional para el diseño e interpretación de experimentos de pérdida de función e interferencia con dominantes negativos. Debido al gran número de procesos de desarrollo en los que intervienen los genes Sox, esta introducción se limitará a la descripción de tan sólo dos de ellos: el proceso de condrogénesis, por ser el que ha permitido un estudio más detallado de la función de LSox5 y de sus interacciones con otros factores de la familia, y el de la formación de la cresta neural, en cuanto a que atañe al grueso de la experimentación llevada a cabo durante la realización de esta tesis doctoral.

2. 3. 3. 1. Las proteínas Sox en la condrogénesis

En líneas generales, el proceso de condrogénesis se puede dividir en dos etapas principales: una primera de condensación de las células mesenquimales y una segunda de diferenciación. Durante la primera, el mesénquima precartilaginoso, proveniente de la cresta neural, el esclerotomo o el mesodermo lateral, se divide en un dominio no condrogénico y otro condrogénico, dando lugar a los condroblastos. Estos condroblastos siguen luego un largo proceso de diferenciación, produciendo abundantes factores de matriz extracelular específicos, como el colágeno de tipo II (codificado por el gen *Col2a1*) y el agregano. Aunque durante este proceso se expresan numerosos factores de transcripción, incluyendo miembros de las familias Hox, Pax, *fork-head* y HLH (*helix-loop-helix*), sólo se ha demostrado un control directo de la diferenciación de los condrocitos para el caso de los factores Sox9, LSox5 y Sox6, así como para Cbfa1 (Fig. 13; de Crombrughe *et al.*, 2001).

Una de las primeras observaciones que permitió intuir la posible intervención de factores Sox en la condrogénesis, fue el hallazgo de numerosas mutaciones de *Sox9* en pacientes con un síndrome conocido como displasia campomélica (OMIM #114290; Foster *et al.*, 1994), en el que la mayor parte de las estructuras derivadas de los cartílagos tienen malformaciones severas, y al que frecuentemente aparece asociado el síndrome de reversión sexual XY (Meyer *et al.*, 1997). Posteriormente, se demostró que el factor *Sox9* era capaz de unirse a un *enhancer* del gen *Col2a1* y activar su transcripción (Lefebvre *et al.*, 1997), que los factores *LSox5* y *Sox6* cooperaban en dicha activación *in vitro*, y que los tres factores Sox se expresan abundantemente en las zonas de condrogénesis activa del ratón (Lefebvre *et al.*, 1998).



De un modo coincidente, en quimeras de ratón desarrolladas a partir de células madre *Sox9*^{-/-}, se mostró la inactivación de varios genes implicados en el desarrollo temprano de los cartílagos, tales como el del colágeno II, *Col2a1* (Bi *et al.*, 1999). El mismo efecto se observó en embriones de ratón dobles nulos para los genes *Sox5* y *Sox6* (Smits *et al.*, 2001). Este esquema transcripcional se clarificó al mostrar la inhibición de la expresión de *Sox5* y *Sox6* que se producía al inactivar *Sox9* mediante el sistema Cre/LoxP en líneas celulares condrogénicas del embrión de ratón. Quedando así demostrado que en los condrocitos *Sox5* y *Sox6* se

encuentran genéticamente bajo el control de *Sox9* (Akiyama *et al.*, 2002). El mismo abordaje experimental se ha usado para estudiar el papel de *Sox9* durante la producción de precursores de condroblastos derivados de la cresta neural, concluyendo que es también necesario para la determinación del linaje condrogénico en dichas células (Mori-Akiyama *et al.*, 2003).

El factor *Sox8* también se ha postulado como participante en el proceso de condrogénesis. Se ha visto que ratones deficientes en *Sox8* presentan huesos de menor tamaño, aunque el fenotipo es mucho menos severo que los descritos para los deficientes en *Sox9* o *Sox5/Sox6*, lo que probablemente es debido a la redundancia funcional entre los factores del grupo E, del cual *Sox8* y *Sox9* forman parte (Sock *et al.*, 2001).

2. 3. 3. 2. Las proteínas Sox en el desarrollo de la cresta neural

Hasta el momento, cuatro genes de la familia Sox habían sido descritos en relación con la cresta neural, tres de ellos pertenecen al grupo E, *Sox8*, *Sox9* y *Sox10*, mientras que el último, *Sox2*, pertenece al grupo B. Entre todos estos factores, el papel de *Sox10* es probablemente el mejor definido hasta el momento.

Sox10 se expresa en la cresta migratoria temprana, y posteriormente se restringe a las células de glía (Bondurand *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2000). En pacientes que sufren de megacolon aganglionar congénito, también conocido como enfermedad de Hirschprung (OMIM #142623), se han encontrado mutaciones que afectan al gen *SOX10*. Este síndrome suele estar asociado con el de Waardenburg-Shah (OMIM #277580), cuyos pacientes presenta numerosos defectos en pigmentación, así como defectos de audición (Pingault *et al.*, 1998). Un modelo de esta enfermedad se encontró en ratones con la mutación espontánea *Dom*. El análisis molecular de esta mutación dio como resultado un cambio puntual en el gen *Sox10* que da lugar a una proteína truncada inactiva. Los ratones heterocigóticos para esta mutación presentan megacolon, y alteraciones en el desarrollo normal de los melanocitos y del sistema nervioso entérico. En los ratones

homozigóticos *Dom* hay una ausencia casi total del sistema nervioso periférico y del linaje de células de Schwann, todos ellos derivados de la cresta neural (Herbarth *et al.*, 1998). Un estudio posterior con células en cultivo en las que la expresión de *Sox10* era inducible, mostró que la expresión de P_0 , una proteína específica de las células de Schwann, es controlada por *Sox10*, el cual es capaz de unirse al promotor del gen que codifica P_0 in vitro (Peirano *et al.*, 2000). La generación de ratones nulos para *Sox10* mostró que los efectos eran similares a los descritos en ratones *Dom*, con la ausencia de glía periférica, incluyendo las células de Schwann (Britsch *et al.*, 2001).

En el pez cebra, el gen *colourless* codifica una proteína homóloga de *Sox10*, y se ha mostrado que es necesario para la especificación de varios derivados de cresta neural (Dutton *et al.*, 2001). También en *Xenopus* se ha descrito la implicación de *Sox10* en el desarrollo de la cresta neural, específicamente en el desarrollo de los melanocitos (Aoki *et al.*, 2003). Y en el pollo se ha visto que se expresa abundantemente en la cresta neural y sus derivados gliales y melanocíticos (Cheng *et al.*, 2000; Paratore *et al.*, 2001; Ghislain *et al.*, 2003). En un trabajo reciente se ha propuesto una doble funcionalidad para *Sox10* dependiente de concentración. Así, a concentraciones menores actuaría en el mantenimiento de la multipotencialidad de las células de la cresta neural, mientras que a concentraciones más altas participaría en la inhibición de la neurogénesis favoreciendo en estas células la diferenciación hacia linajes gliales y melanocíticos (Kim *et al.*, 2003).

Sox9 se había estudiado en la cresta neural por su relación con los derivados cefálicos que dan lugar a la formación de cartílagos y huesos (Mori-Akiyama *et al.*, 2003). Sin embargo, trabajos recientes le confieren un papel más determinante en la propia especificación de la cresta neural. En *Xenopus* se detecta *Sox9* muy temprano en los bordes de la placa neural que posteriormente darán lugar a la formación de cresta. En este territorio su expresión es coincidente con la de *Slug*, que en *Xenopus* es también uno de los primeros genes de la cascada que conduce a la formación de cresta neural (Mayor *et al.*, 1995). La inhibición de la traducción de *Sox9* mediante

el uso de morfolinós antisentido produce una disminución de la expresión de numerosos genes característicos de la cresta neural como *Slug*, *Snail*, *Twist* y *FoxD3*, a la vez que se produce una expansión de la placa neural medido por la mayor expresión de *Sox2*. La consecuencia es la ausencia de derivados craneofaciales (Spokony *et al.*, 2002). También se ha propuesto un papel similar para *Sox9* en el control de la formación de cresta neural en pollo. La sobre-expresión de *Sox9* en el tubo neural produce un aumento de la expresión de *Slug*, *FoxD3* y *Sox10*, así como la delaminación masiva de células de cresta a costa de la depleción de otros tipos celulares del tubo neural (Cheung y Briscoe, 2003). Curiosamente esta generación masiva de cresta neural cursa sin un aumento de la expresión de *RhoB*, por lo que los autores proponen la existencia de mecanismos alternativos de la TEM independientes de esta GTPasa. El exceso de cresta así generado deriva hacia fenotipos gliales o melanocíticos, expresando marcadores como P_0 al tiempo que se reduce la expresión de marcadores neuronales como Pax7 o Islet1/2. En conclusión, los autores proponen dos puntos de acción para *Sox9*: uno en la especificación inicial de los progenitores de la cresta neural a partir de las células del neuroepitelio, y otro en la posterior selección de fenotipos no neurales en la cresta neural migrante.

El papel de *Sox2* en el desarrollo de la cresta neural es bastante anterior a los dos genes antes mencionados, y tiene un carácter inhibitorio. Estudios en el embrión de pollo muestran que, en este caso, *Sox2* se expresa en toda la placa neural, y posteriormente su expresión desaparece de los bordes de la misma, allí de donde surgirá la cresta neural. Así, la sobre-expresión ectópica de *Sox2* en los bordes de la placa neural produce una inhibición de la generación de cresta neural y un bloqueo de la TEM, concomitante con la disminución de la expresión de *Slug* (Wakamatsu *et al.*, 2004). La expresión de *Sox2* en cresta neural migratoria produce un aumento de la proliferación, así como una inhibición de la diferenciación de dichas células, aunque el mecanismo parece bastante complejo y podría ser dependiente de la expresión concurrente de otros factores Sox.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Antecedentes: Con el fin de encontrar nuevos genes implicados en el desarrollo temprano del sistema nervioso del embrión de pollo, se realizó una búsqueda mediante la técnica de hibridación sustractiva. Para ello se enfrentaron las poblaciones de cDNA correspondientes a dos estadios de desarrollo diferentes, en concreto, a las regiones cefálicas de embriones HH8 y HH11. Entre los clones positivos que se obtuvieron, que representan a genes cuya expresión aumenta significativamente entre estos dos estadios de desarrollo, uno mostraba una gran similitud de secuencia con factores de transcripción de la familia Sox, así como un patrón de expresión muy llamativo en la cresta neural.

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha consistido en la caracterización estructural y funcional de este gen, que resultó ser el ortólogo en el pollo del factor de transcripción LSox5.

Para ello se programó:

- Clonar cDNAs completos del nuevo factor de transcripción y analizar la estructura de los productos codificados por ellos.
- Generar anticuerpos y sondas de RNA específicas y con ellas analizar el patrón de expresión detallado de este factor durante el desarrollo temprano del sistema nervioso en el embrión de pollo.
- Interferir con el factor endógeno mediante experimentos de ganancia y pérdida de función in vivo e in vitro, y analizar los marcadores necesarios para extraer las conclusiones funcionales de los mismos. Puesto que la cresta neural cefálica es la población celular donde la expresión de este factor es mayoritaria, hemos centrado en ella este análisis funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. 1. EMBRIONES DE POLLO

Los huevos fecundados de gallina se obtuvieron de la Granja Santa Isabel, Córdoba. Los huevos fueron incubados en una estufa saturada de humedad, a 38,5°C. El estadio de desarrollo de los embriones se estableció de acuerdo con Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1951).

4. 2. CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DEL *LSox5* DE POLLO

Un primer fragmento de cDNA de *LSox5* de pollo se aisló de una librería de cDNA generada mediante una hibridación sustractiva, usando el "Clontech PCR select-cDNA subtraction kit" (Clontech, Cat. #K1804-1). Para ello, la población de cDNAs procedente de la porción anterior de embriones de pollo de estadio HH8 fue contrastada con la obtenida a partir de la región más rostral de embriones de estadio HH11. Uno de los clones aislados era un fragmento parcial de *LSox5*, y el cDNA completo de *LSox5-I* y *LSox5-II* (2,3 y 2,4 kbp, respectivamente) fue obtenido por medio de extensión mediante PCR, usando una librería lambda zap de cDNA de embriones de pollo de E2.

La secuencia de nucleótidos de *LSox5-I* y *LSox5-II* aparecen en las bases de datos de secuencias de nucleótidos EMBL, GenBank y DDBJ bajo los números de acceso AJ626988 y AJ626989. Una forma corta de *Sox5*, denominada *SSox5*, se obtiene a partir de la delección de los primeros 1248 nucleótidos codificantes de *LSox5-II*.

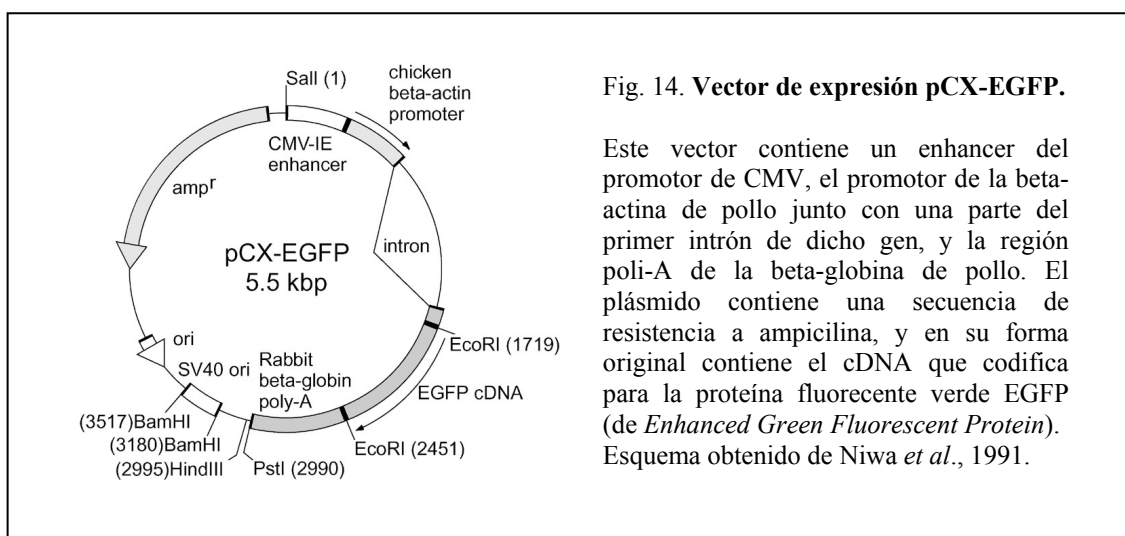
La expresión de las dos isoformas de *splicing* de *LSox5* se comparó mediante RT-PCR, usando los siguientes oligonucleótidos flanqueantes:

Sentido: 5'-CTCCCAGCCTTTCACCTTCCC-3'

Antisentido: 5'-GCTTTCTGGAGTCCCTTTTAT-3'

4. 3. PLÁSMIDOS USADOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN EL EMBRIÓN DE POLLO

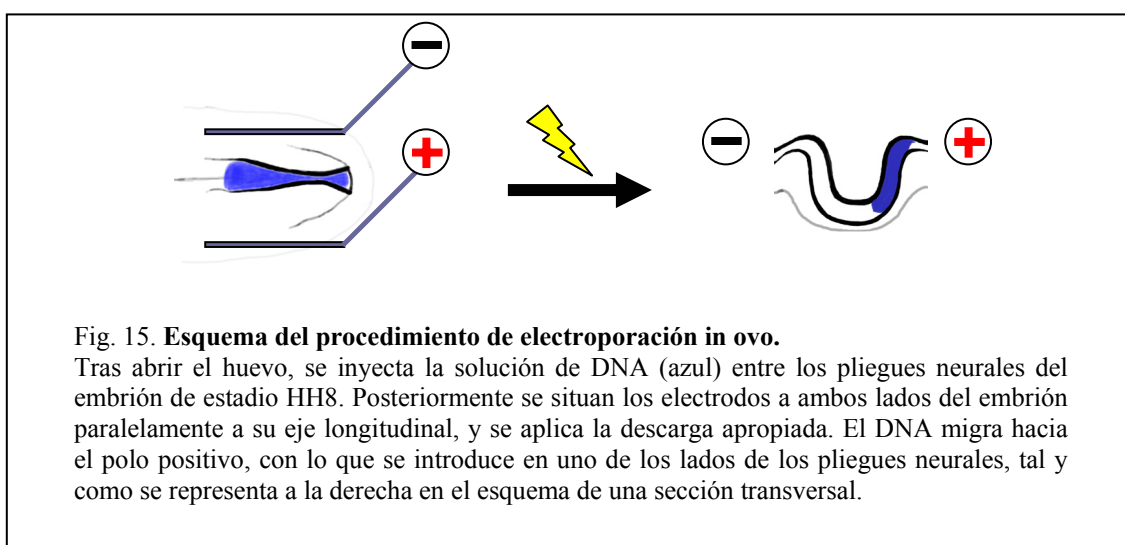
Con el fin de obtener altos niveles de expresión inducida de las proteínas de interés en el embrión de pollo, se clonaron los cDNAs que las codifican en el vector pCX-EGFP (Fig. 14, Niwa *et al.*, 1991). Dicho vector contiene el promotor de la β -actina de pollo, así como otra serie de regiones reguladoras que hacen que se alcancen niveles mucho más altos de expresión en el pollo que los que se consiguen con otro tipo de vectores. Tras escindir la secuencia que codifica para la EGFP mediante la digestión del vector con EcoRI, los cDNAs de interés se insertaron en su lugar, generando los siguientes plásmidos: pCX-LSox5 (codifica para la forma LSox5-II, de 772 aa.), pCX-SSox5 (356 aa.), pCX-LSox5-M569I (772 aa.) y pCX-LSox5 Δ HMG (507 aa.).



Los plásmidos se purificaron en altas cantidades con el kit "EndoFree Plasmid Maxi Kit" (Qiagen Cat. #12362), para su posterior introducción mediante electroporación en el embrión de pollo. La correcta expresión de las secuencias introducidas fue analizada por hibridación *in situ* y por inmunohistoquímica.

4. 4. ELECTROPORACIÓN *IN OVO*

Los plásmidos descritos en el apartado anterior fueron inyectados a una concentración de 4 mg/ml entre los pliegues neurales de embriones de estadio HH8, junto con 0,5 mg/ml de PCX-EGFP, que sirve como control de la transfección. El DNA se disuelve a la concentración mencionada en PBS con 2,5% de sacarosa, y se añade el colorante Fast Green (Sigma Cat. #F7258) al 0,1% para facilitar el progreso de la inyección. Los embriones fueron electroporados inmediatamente después, tal y como se describe en Itasaki *et al.*, 1999, aunque con algunas modificaciones (Fig. 15). La electroporación se llevó a cabo con un generador de pulsos cuadrados de la marca Intracel, modelo TSS20, programado para que aplicara 5 descargas de 15V y 50 ms de duración, con una frecuencia de 4Hz, a través de unos electrodos de platino diseñados para tal efecto.



Los electrodos están fabricados con hilo de platino de 0,4 mm de diámetro, y tienen 1 mm de longitud expuesta, situándose con una distancia de 2 mm entre ellos. La parte no expuesta fue aislada por medio de capilares de borosilicato y laca. Se electroporó sistemáticamente el lado derecho del embrión, y la polaridad de los electrodos se invirtió tras cada tren de pulsos, con el fin de mantener constantes las propiedades conductoras del material. Tras la electroporación, se aplicó inmediatamente PBS sobre el embrión, y los huevos fueron sellados de nuevo y devueltos al incubador durante el periodo de tiempo deseado. Después de transcurrido

dicho tiempo de incubación, los embriones se extrajeron y se procesaron adecuadamente para hibridación *in situ* o inmunohistoquímica.

Las electroporaciones control fueron realizadas inyectando únicamente pCX-EGFP, a una concentración de 4,5 mg/ml.

4. 5. HIBRIDACIÓN *IN SITU IN TOTO*

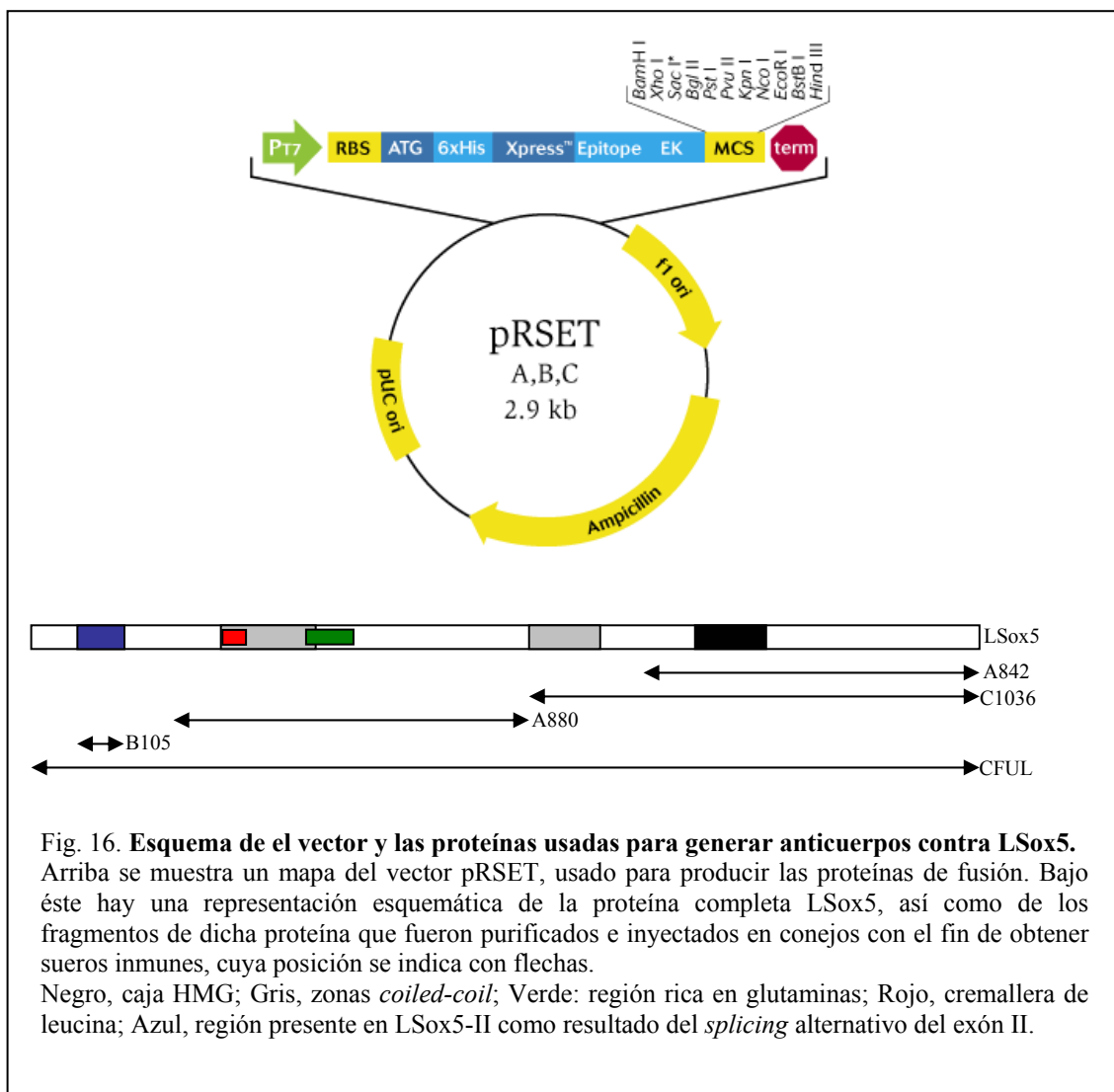
La hibridación *in situ in toto* sencilla y doble fue realizada tal y como se describe en Nieto *et al.*, 1996. Para la hibridación *in situ* doble, una de las sondas fue marcada con Digoxigenina-UTP, mientras que la otra se marcó con Fluoresceína-UTP. Las sondas fueron detectadas usando anticuerpos anti-digoxigenina y anti-fluoresceína acoplados a fosfatasa alcalina, y revelados con NBT-BCIP (azul) o INT-BCIP (rojo). Todos los reactivos y anticuerpos son de Roche. Las sondas contra *LSox5* se prepararon a partir de la forma completa del cDNA de *LSox5-II*. Cuando la sonda de *LSox5* se usaba como control de la electroporación no se dejaba revelar al máximo, con el fin de no enmascarar la tinción del gen de interés. Los embriones eran posteriormente fotografiados antes de ser embebidos en gelatina o agarosa para ser cortados con el vibratomo.

Entre paréntesis se especifica el número de acceso y la región de cDNA usada para generar las sondas usadas: *LSox5* (AJ626989: *LSox5-II* completo), *Wnt-1* (X81693: 1-403), *RhoB* (NM_204909: 294-884), *BMP4* (X75915: 187-953), *BMP7* (AF205877: 281-1001), *Slug* (X77572: 12-818), *Sox10* (NM_204792: 167-1552), *Sox9* (U12533: 599-1328), *FoxD3* (U37274: 145-779), *N-cadherina* (X07277: 35-2773).

4. 6. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *LSox5*

Tanto para su uso como herramienta en algunos ensayos bioquímicos como para poder abordar un estudio en detalle del patrón de expresión de *LSox5* por inmunohistoquímica, se generaron anticuerpos que reconocieran

específicamente esta proteína. Para ello se diseñaron distintas construcciones de fusión (con una secuencia de 6 histidinas) en el vector de expresión en procariontes pRSET (Fig. 16, Invitrogen Cat. # V351-20), tanto con diferentes fragmentos de LSox5, como con la proteína completa. Un esquema de las regiones de LSox5 que usamos puede verse en la figura 3. Las proteínas de fusión se expresaron en cultivos de *E. coli* y se purificaron utilizando columnas de afinidad con Ni^{2+} "His-Bind Quick 900" (Novagen Cat. #70156-3). Posteriormente, las proteínas purificadas se inyectaron en conejos siguiendo protocolos convencionales. Los distintos sueros obtenidos se ensayaron tanto en *western blot* como en inmunohistoquímica.



4. 7. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA

La inmunohistoquímica *in toto* para HNK1 fue realizada como se describe en Nieto *et al.*, 1996.

Para la inmunohistoquímica en secciones, las secciones de 10 µm de grosor obtenidas en el criostato, o las de 40 µm recogidas en el vibratomo, fueron tratadas con 0,5% Triton X-100 (USB), bloqueadas con 10% FBS, e incubadas toda la noche a 4°C con el o los anticuerpos primarios adecuados. Después de lavar, las secciones se incubaron durante 1 hora a 4°C con los anticuerpos secundarios, o toda la noche a 4°C si se trataba de las secciones de vibratomo.

Las cultivos de CEFs sobre los que se realizó la inmunocitoquímica contra LSox5 y GAG se fijaron 30 minutos en 2%PFA en PBS a 4°C, las incubaciones con anticuerpos se hicieron a 4°C durante 30 minutos, y se revelaron usando el "VECTASTAIN-ABC kit" (Vector Cat. #PK-4000) y DAB (Sigma Cat. # D- 4293).

Se usaron los siguientes anticuerpos primarios a las diluciones detalladas: LSox5 1:4000, Slug 1:1000 (62.1E6, DSHB; Liem *et al.*, 1995), P0 1:1000 (1E8, DSHB; Bhattacharyya *et al.*, 1991), HNK-1 1:4000 (preparado a partir de una línea celular obtenida de ATCC), Islet-1/2 1:1000 (40.2D6, DSHB; Ericson *et al.*, 1992), Brn3a 1:1000 (Chemicon Cat. #MAB1585), Pax7 1:1000 (PAX7, DSHB; Ericson *et al.*, 1996), GAG 1 :2000 (AMV-3C2, DSHB; Potts *et al.*, 1987). Se usaron anticuerpos secundarios acoplados a Cy2, Cy3 o biotina (Jackson; dilución 1:1000).

4. 8. PRODUCCIÓN DE RETROVIRUS E INFECCIÓN DE CULTIVOS DE CEFs

Los cDNAs de las formas *LSox5-I* (737 aa.) y *LSox5-II* (772 aa.) fueron primero clonados en el vector SLAX12-NCO (Hughes *et al.*, 1987).

Este plásmido contiene la región 5' no traducida (5'-UTR) del gen *src*, que al fusionarse al ATG inicial del cDNA de interés permite aumentar significativamente los niveles de expresión que se conseguirán con la infección viral. Para ello, la secuencia en torno al codon de iniciación de *LSox5* se mutagenizó con el fin de introducir un sitio de restricción NcoI que permitiera fusionar el ATG inicial a la secuencia 5'-UTR de *src*. Una vez clonados en SLAX12-NCO, se escindieron por digestión con ClaI y se introdujeron los insertos en el vector retroviral RCASB (Hughes y Kosik, 1984). El resto del procedimiento para la obtención de retrovirus es el descrito en Morgan y Fekete, 1996. Se alicuotaron los virus obtenidos y se guardaron a -80°C. La correcta expresión de los cDNAs insertados fue analizada por inmunocitoquímica y *western blot*.

Los fibroblastos embrionarios de pollo fueron extraídos tal y como se describe en el capítulo 2.1 de "Current Protocols in Cell Biology". Se produjeron fibroblastos en abundancia, y fueron alicuotados y conservados en nitrógeno líquido.

Para producir cultivos infectados, se descongelaron alícuotas de CEFs de las antes mencionadas, y se infectaron con una alícuota de virus. Posteriormente el cultivo era expandido y replaqueado un par de veces, para permitir una infección homogénea de todas las células, ya que los virus sólo son capaces de integrarse en células en proceso de replicación.

RESULTADOS

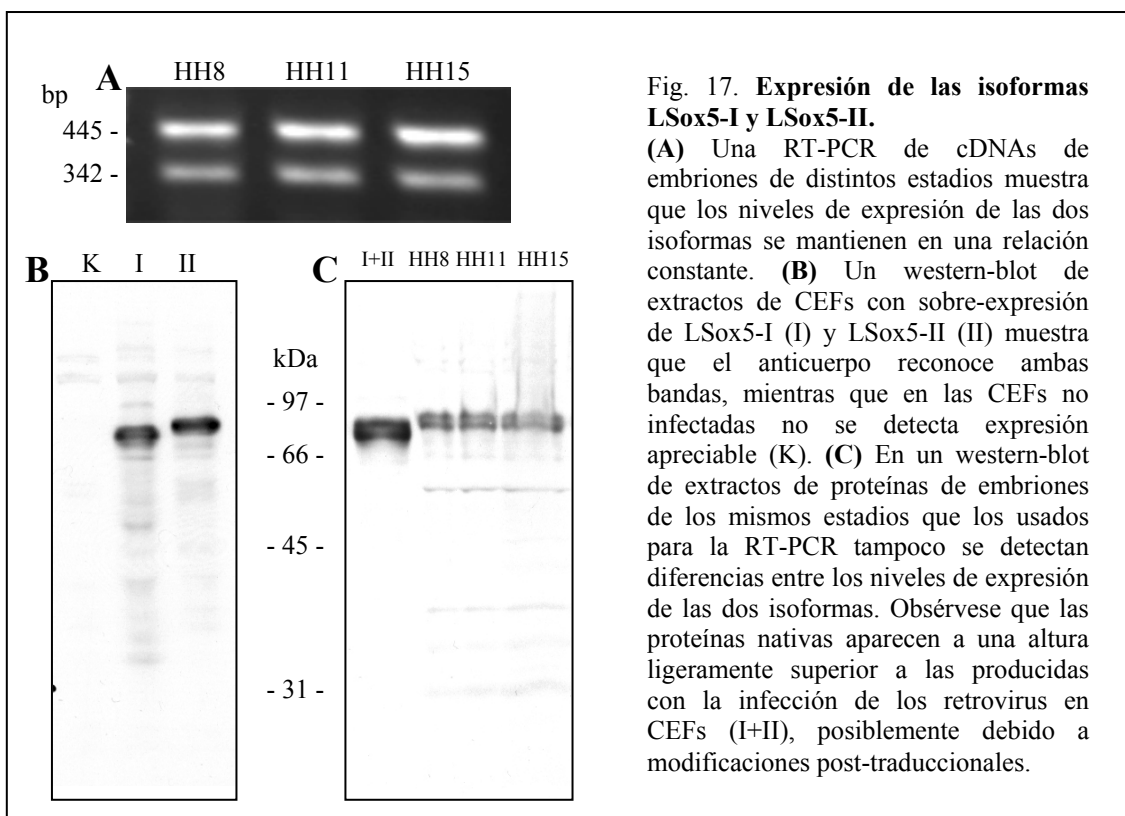
5. RESULTADOS

5. 1. CLONACIÓN Y ANÁLISIS DE *LSox5*

5. 1. 1. Obtención de los cDNAs completos de *LSox5*

Un fragmento original de cDNA, procedente de un experimento de hibridación sustractiva, resultó corresponder al ortólogo en pollo del gen *Sox5*; en particular, a la isoforma larga (*LSox5*) descritas en mamíferos (Lefebvre et al., 1998). Este fragmento se utilizó como punto de partida para la obtención de cDNAs con la secuencia codificante completa. A partir de una genoteca de cDNAs de embriones de pollo de 2 días de desarrollo embrionario, y mediante la técnica de "PCR walking", se aislaron dos isoformas distintas que difieren en la inclusión alternativa de un fragmento de 105 pares de bases. La forma más corta se denominó *LSox5-I*, y la más larga *LSox5-II*. Las secuencias de nucleótidos correspondientes se encuentran depositadas en los bancos de datos del EMBL, GenBank y DDBJ con los números de acceso AJ626988 y AJ626989 respectivamente.

Para comprobar que las dos isoformas clonadas se expresaban durante el desarrollo del embrión de pollo, y ver si había cambios en los niveles de expresión relativos de cada una, hicimos un análisis por RT-PCR con oligos que discriminaban las dos isoformas (ver materiales y métodos). Se obtuvieron cDNAs a partir de embriones de estadios HH8, HH11 y HH15 (entre E1 y E2_{1/2}), y no se detectaron diferencias en la expresión relativa de las dos isoformas (Fig. 17, A). Dado que los cDNAs se obtuvieron a partir de embriones completos, no se puede descartar que existan diferencias locales de expresión de las dos isoformas en distintas regiones del embrión.



5. 1. 2. Verificación de los sueros α -LSox5

En la sección de Materiales y métodos (apartado 4.6) se describe la estrategia utilizada para la obtención de diferentes antisueros contra la proteína LSox5. De todos los sueros analizados, los generados contra la proteína completa (CFUL), así como los generados contra la región intermedia A880, fueron los que dieron los mejores resultados tanto en *western blot* como en inmunohistoquímica. Para dar coherencia a los resultados presentados en esta memoria, todos ellos fueron obtenidos con el mismo suero, en concreto fue uno de los dirigidos contra la región A880. También se hizo el intento de generar anticuerpos específicos contra el dominio específico de LSox5-II (suero B105), que no resultó exitoso.

Para comprobar la especificidad de los distintos sueros en *western blot*, se utilizaron extractos de cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo (CEFs), infectados con retrovirus (RCAS) que expresaban una de las dos isoformas de LSox5 (I ó II). En un *western blot*

de dichos cultivos pudimos observar el reconocimiento específico de la isoforma de *LSox5* expresada en cada caso, frente a un control (fibroblastos sin infectar) nulo (Fig. 17, B). Los niveles basales de expresión de *LSox5* en los fibroblastos control se corroboraron mediante RT-PCR de estos cultivos, aunque la cantidad de proteína resultó insuficiente para ser detectada por *western blot*.

Hicimos también un estudio de extractos de embriones de distintos estadios de desarrollo, entre HH8 y HH15. En todos los casos se detectaron dos bandas específicas, que asociamos con las dos isoformas descritas *LSox5-I* y *II*. No detectamos diferencias relativas en los niveles de expresión de ambas bandas en las muestras analizadas (Fig. 17, C). De nuevo, dado que los extractos de proteínas, al igual que los de cDNA antes mencionados, fueron realizados a partir de embriones completos, no se puede descartar la posibilidad de diferencias relativas locales en distintas estructuras del embrión.

5. 1. 3. Análisis estructural de la proteína

Los cDNAs *LSox5-I* y *LSox5-II* codifican polipéptidos con una longitud de 737 y 772 aminoácidos y pesos moleculares de 80,99 y 84,95 kDa, respectivamente. La región de 35 aminoácidos adicionales que contiene la forma larga se inserta en la posición 56 de la proteína. La comparación de la secuencia de aminoácidos codificada por *LSox-II* con las secuencias correspondientes de mamíferos (Hiraoka et al., 1998; Ikeda et al., 2002) resulta en un porcentaje de identidad del 95,7% respecto al ortólogo humano, y un 93% respecto al ortólogo de ratón (Fig. 18)

Mediante el uso de distintas herramientas informáticas (*PROSITE*: Falquet et al., 2002; *Paircoil*: Berger et al., 1995; *NetPhos*: Blom et al., 1999; *2ZIP*: Bornberg-Bauer et al., 1998), se pueden identificar varios dominios estructurales en la secuencia de aminoácidos de este factor.

RESULTADOS

1	MLTDPDLPQEFERMSSKRPASPYGEADGEVAMVTSRQKV	GG
1	MLTDPDLPQEFERMSSKRPASPYGEADGEVAMVTSRQVVEEES	mm
1	MLTDPDLPQEFERMSSKRPASPYGEADGEVAMVTSRQVVEEES	hs
71	SLLTQENCGHRTPTSQHNTMEVDGNKAMSSFAPHNSSTSP	gg
71	SLLTQETCGHRTPTVQHNTMEVDGNKVMSSLS	mm
71	SLLTQETCGHRTPTSQHNTMEVDGNKVMSSFAPHNSSTSP	hs
141	DVVDTLKQKMEELIKNEPEETPSIEKLLSKDWKDKLLAMGSGNFGEIKGTPE	gg
141	DVVDTLKQKMEELIKNEPEETPSIEKLLSKDWKDKLLAMGSGNFGEIKGTPE	mm
141	DVVDTLKQKMEELIKNEPEETPSIEKLLSKDWKDKLLAMGSGNFGEIKGTPE	hs
211	SLREQLLAAHDEQKKLAASQIEKQROQMELAKQOQEQIARQOQQLLQOQH	gg
211	SLREQLLAAHDEQKKLAASQIEKQROQMELAKQOQEQIARQOQQLLQOQH	mm
211	SLREQLLAAHDEQKKLAASQIEKQROQMELAKQOQEQIARQOQQLLQOQH	hs
281	PVFPPDQRTLAAAAQQGFLLPFGFSYKAGCSDPYPVQLIPTTMAAAAAATPGLG	gg
281	PVFPPDQRTLAAAAQQGFLLPFGFSYKAGCSDPYPVQLIPTTMAAAAAATPGLG	mm
281	PVFPPDQRTLAAAAQQGFLLPFGFSYKAGCSDPYPVQLIPTTMAAAAAATPGLG	hs
351	VSPGGKIPGISQGNLGAASVPTSHTDKSTNSPPPKSKDEVAQPLNLSAKPKTSDGKSPTS	gg
351	VSPGGKLLGLPQGNLGAASVPTSHTDKSTNSPPPKSKDEVAQPLNLSAKPKTSDGKSPTS	mm
351	VSPGGKLLGLPQGNLGAASVPTSHTDKSTNSPPPKSKDEVAQPLNLSAKPKTSDGKSPTS	hs
421	RINSGLTSSLKSVPAI LASPSARANTIDILSSITSSGYLNDHDAVTKAIQEARQMKELRREQQVLDGKV	gg
421	RINSGLTSSLKSVPAI LASPSARANTIDILSSITSSGYLNDHDAVTKAIQEARQMKELRREQQVLDGKV	mm
421	RINSGLTSSLKSVPAI LASPSARANTIDILSSITSSGYLNDHDAVTKAIQEARQMKELRREQQVLDGKV	hs
491	AVVNSLGLNNCRTEKDKTTLETLTQQLAVKQSEDKGFSHAMMDFNMGSDSDGSAGVSESRIRYRESRGRGS	gg
491	AVVNSLGLNNCRTEKDKTTLETLTQQLAVKQSEDKGFSHAMMDFNMGSDSDGSAGVSESRIRYRESRGRGS	mm
491	AVVNSLGLNNCRTEKDKTTLETLTQQLAVKQSEDKGFSHAMMDFNMGSDSDGSAGVSESRIRYRESRGRGS	hs
561	NEPHIKRPMNAFMVWAKDERRKILQAFDPMHNSNISILGSRWKAMTNLEKQPYEEQARLSKQHLEKYP	gg
561	NEPHIKRPMNAFMVWAKDERRKILQAFDPMHNSNISILGSRWKAMTNLEKQPYEEQARLSKQHLEKYP	mm
561	NEPHIKRPMNAFMVWAKDERRKILQAFDPMHNSNISILGSRWKAMTNLEKQPYEEQARLSKQHLEKYP	hs
631	DYKYKPRPKRTCLVDGKKLRIGEYKAIMRNRQEMRQYFNVGQQAQIPIATAGVVYPGAIAMAGMPSPHL	gg
631	DYKYKPRPKRTCLVDGKKLRIGEYKAIMRNRQEMRQYFNVGQQAQIPIATAGVVYPGAIAMAGMPSPHL	mm
631	DYKYKPRPKRTCLVDGKKLRIGEYKAIMRNRQEMRQYFNVGQQAQIPIATAGVVYPGAIAMAGMPSPHL	hs
701	PSEHSSVSSPEPGMPVIQSTYGIKGEEPHIKEEMQTDVNGEYDEYDEEEDDPDVDYGSSENHIAQGAN	gg
701	PSEHSSVSSPEPGMPVIQSTYGIKGEEPHIKEEMQTDVNGEYDEYDEEEDDPDVDYGSSENHIAQGAN	mm
701	PSEHSSVSSPEPGMPVIQSTYGIKGEEPHIKEEMQTDVNGEYDEYDEEEDDPDVDYGSSENHIAQGAN	hs

Fig. 18. Análisis estructural y comparativo de la proteína LSox5.

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de LSox5 de pollo (gg), ratón (mm) y humano (hs). La región alternativa de las isoformas LSox-I y II está sombreada en azul, mientras que el primer aminoácido de la isoforma corta (SSox5) se señala en rojo. Los residuos que se apartan de un consenso están sombreados en amarillo. La caja HMG se representa con letras en blanco sobre fondo negro. Las secuencias de localización nuclear están subrayadas por una línea de puntos, mientras que las regiones *coiled-coil* tienen un subrayado continuo. El color del fondo distingue los distintos dominios estructurales: naranja, cremallera de leucina; morado, región rica en glutaminas; verde, región presente únicamente en el pollo.

Herramientas de análisis utilizadas: *PROSITE* (Falquet et al., 2002); *Paircoil* (Berger et al., 1995); *NetPhos* (Blom et al., 1999); *2ZIP* (Bornberg-Bauer et al., 1998)

La caja HMG de unión al DNA se localiza entre los aminoácidos 564-642. Dentro de la caja HMG se detectó también la presencia de una secuencia de localización nuclear, la cual ya había sido descrita para otros factores de la familia Sox, como Sox9 y Sry (ver introducción). Se

encontraron asimismo otras dos secuencias de localización nuclear en otras partes de la proteína, una entre los aminoácidos 134-151, y otra entre las posiciones 647-663, aunque no se ha comprobado empíricamente su funcionalidad.

Apareció también una región rica en glutaminas que, si bien no tiene una función definida, se ha descrito que podría participar en la interacción entre proteínas. La búsqueda de otras regiones que pudieran mediar interacciones entre proteínas permitió encontrar dos regiones *coiled-coil*, una situada entre los aminoácidos 193-247, y otra entre los residuos 462-491. Dentro de la primera región *coiled-coil* se detectó también la presencia de una secuencia que permite la formación de cremalleras de leucina, entre las posiciones 195-216. Todo esto hace que las formas largas de Sox5 (LSox5) tengan un potencial para interactuar con otras proteínas mucho mayor que la forma corta (SSox5) que inicialmente se había descrito en el ratón, y que carecía de todas estas regiones (Denny et al., 1992). Se pudo observar que la identidad entre las tres especies era total dentro de la caja HMG, en la primera región *coiled-coil*, y en la región rica en glutaminas, lo cual puede dar una medida de la importancia de todas estas regiones para la función de la proteína.

Un aspecto muy llamativo del análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos es el hecho de que, a pesar del alto porcentaje de identidad entre ellas, el número de residuos con grupos hidroxilo (serina y treonina) es un 10% más alto en el caso de la proteína de pollo [113 frente a 101(humano) ó 102(ratón)]. Además, cabe destacar que la mayor parte de las sustituciones que dan lugar a serinas o treoninas adicionales se encuentran concentradas en una pequeña región, entre las posiciones 426 y 456. Más aún, la secuencia de pollo contiene un dominio de 9 aminoácidos, ausente en las secuencias de mamíferos (ver más adelante el análisis genómico), con cuatro serinas y una treonina suplementarias. Cuando analizamos las tres secuencias en busca de sitios putativos de fosforilación comprobamos que la proteína de pollo contiene en total de 63, un 14% más de sitios respecto a las proteínas descritas en mamíferos. Justo en el dominio de 9 aminoácidos exclusivo de la secuencia pollo se concentran 3

de estos sitios potenciales de fosforilación. Esto puede reflejar la importancia de los mecanismos de regulación por fosforilación de la actividad de LSox5, y el hecho de que algunos de estos mecanismos sean específicos del pollo.

5. 1. 4. Análisis genómico del gen Sox5 de pollo

Recientemente se ha hecho pública y accesible a través de Internet una versión preliminar del genoma del pollo (<http://www.ensembl.org/>), lo que nos ha permitido hacer un estudio inicial de la estructura del gen Sox5 en esta especie. Debido a que la secuencia genómica está todavía incompleta, no hemos podido localizar aún los primeros 76 nucleótidos de nuestra secuencia de cDNA; el resto ha sido localizado totalmente en una región que se extiende a lo largo de unas 250 kbp en el cromosoma 1 del pollo. La distribución de intrones y exones es básicamente como la que se ha descrito para el gen humano (Ikeda et al., 2002) (ver Fig. 19 y Tabla 1). El dominio de 105 nucleótidos que diferencia las isoformas LSox5-I y II se genera mediante el uso alternativo de dos sitios donadores durante el procesamiento (*splicing*) del exón II.

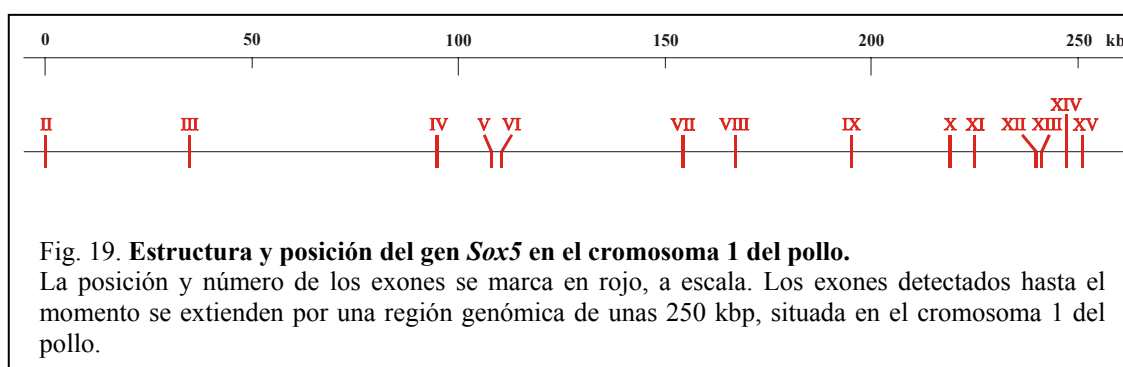


Tabla 1. Bordes Intrón-Exón en el gen *Sox5* del pollo*

Exón num.	Tamaño del exón (bp)	Sitio aceptor	Sitio donador	Comienzo	Fin
Ila	232	ttccttccag GATGTCTTCC	CAACACAATG gtaggtttgc	62.526.687	62.526.918
Ilb	127	ttccttccag GATGTCTTCC	TCCCTTGCAAT gtaggttttc	62.526.687	62.526.813
III	211	cttctttcag GAAGTTGATG	GAACCAGAAG gtaaggcctg	62.561.475	62.561.685
IV	87	cttcactcag AACTCCCAAG	GAAATAAAAG gtaacgcctc	62.621.206	62.621.292
V	173	tgatgcccag GGAATCCAGA	ACAGGAACAG gtaggtgatt	62.634.657	62.634.829
VI	69	ttctccacag ATTGCAAGAC	ACAGATCCAG gtcagagact	62.637.330	62.637.398
VII	121	tggtcagcag GTCCAGGGTC	GCGGGATGCA gtaagtcctg	62.681.278	62.681.438
VIII	86	tcttacttag GTGACCCCTA	CCAACTGCAG gtaagtggca	62.694.300	62.694.385
IX	147	gctttttacag CAGTTGTATG	CAAAAGCAAG gtactgtacc	62.723.455	62.723.601
X	178	ctcatcgtag GATGAAGTGG	AACACAATAG gtaagatcac	62.745.501	62.745.678
XIa	173	tttttttaag ATATCCTTTC	GACAGAAAAG gtcagtggct	62.751.433	62.751.605
XIb**	146	acgtcgtag GTTATTTAAA	GACAGAAAAG gtcagtggct	62.751.433	62.751.605
XII	109	ccccatgtag GACAAAACGA	GATTCTGATG gtcagtacaa	62.766.837	62.766.945
XIII	174	ctcttttttag GAAGTGCAGG	AAGATACTAG gtaagtgttg	62.767.803	62.767.975
XIV	217	tttgtggcag GATCTCGCTG	TTAATGTTGG gtatgggacc	62.774.340	62.774.556
XV	-	tccattgcag GCAACAAGCA	-	62.777.731	-

* Los límites intrón-exón se identificaron comparando la secuencia de cDNA de *LSox5* con los datos preliminares del primer borrador del genoma del pollo disponibles en el Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>). Se muestran diez bases a cada lado de los bordes exón-intrón. La secuencia del exón está escrita en mayúsculas, mientras que las secuencias donadoras yceptoras del *splicing* aparecen reflejadas en minúsculas. Las posiciones de la primera y última base de cada exón en el cromosoma 1 se indican en las dos últimas columnas.

** Sitio aceptor de *splicing* deducido después del rastreo la base de datos de ESTs de pollo BBSRC (<http://www.chick.umist.ac.uk>).

El rastreo de un banco de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de pollo nos ha permitido comprobar la existencia de isoformas que carecen del dominio de 9 aminoácidos rico en serinas que se encuentra entre las posiciones 449-458 (ver más arriba). Asimismo el análisis de la secuencia genómica ha mostrado que la inclusión de este motivo se genera por el procesamiento alternativo del exón XI del pollo, que posee dos posibles sitios aceptores del *splicing*.

Curiosamente, cambios puntuales en los genes ortólogos de los tres mamíferos analizados (humano, ratón y rata) hacen inviable la inclusión de este dominio en la secuencia de *LSox5*, por lo que sólo se encuentran isoformas carentes de él. En el caso del ratón y la rata, por la eliminación del primer sitio aceptor del *splicing* (mutación ag > tg). En el caso del gen

humano el sitio aceptor no varía, pero un cambio puntual en una posición más avanzada hace que, en el caso de que el primer sitio aceptor se llegara a utilizar, la proteína resultante sería una forma truncada afuncional. En el extremo opuesto, el análisis de los genomas del pez cebra y de *Fugu* ha puesto de manifiesto que en estos organismos se han producido cambios puntuales que hacen desaparecer el segundo sitio aceptor de *splicing* y, en consecuencia, generan exclusivamente isoformas que sí contienen este dominio estructural (Fig. 20).

Pollo:	aagATATCCTTTCTTCTATCACGTCGTCAGGTTATTAAATGACCATGATGCTGTTACC <u>D I L S S I T S S</u> G Y L N D H D A V T
Humano:	aagatatacctt tga ctctgtctcatgttcagGTTACTTAAATGACCATGATGCTGTCACC d i l . s v s c s G Y L N D H D A V T
Ratón:	t gta-catctattgtgtcttgttccagGCTATTAAATGACCACGATGCTGTCACC G Y L N D H D A V T
Rata:	t gta-catgtactgtgtctcattccagGTTATTAAATGACCACGATGCTGTCACC G Y L N D H D A V T
Pez cebra:	cagACCTGTTATCATCCATCACCTCTGC CG GCTACCTGAATGACCATGAGGCCGTGACC <u>D L L S S I T S A</u> G Y L N D H E A V T
<i>Fugu</i> :	cagATGTGCTGTCATCGCTGTCCTCCTC CG CTTATCTGAACGACCATGAGGCCGTGACC <u>D V L S S L S S S</u> A Y L N D H E A V T

Fig. 20. Comparación de los bordes del exón XI del gen *Sox5* de diversas especies.

En rojo aparecen sombreados los dos aceptores de *splicing* posibles presentes en el exón XI del pollo, y en letras rojas la secuencia de aminoácidos alternativa que producen. En las secuencias de mamíferos aparecen marcados en amarillo los cambios de bases que hacen que el *splicing* en el primer sitio aceptor sea imposible, ya sea porque se pierde, o porque genera una fase de lectura que produce una proteína truncada (traducida en minúsculas). Este primer sitio aceptor aparece conservado en otros vertebrados, como pez cebra o *Fugu*, mientras que se pierde el segundo, también resaltado en amarillo, por lo que siempre llevan la secuencia de aminoácidos escrita en azul. Datos obtenidos de la base de datos de ESTs de pollo BBSRC (<http://www.chick.umist.ac.uk>), así como del Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>).

5. 2. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LSox5

5. 2. 1. Expresión del mRNA de LSox5 en territorios de cresta neural

Las isoformas largas de *Sox5* fueron identificadas inicialmente en el ratón, donde se ha mostrado su implicación en el proceso de condrogénesis (Lefebvre *et al.*, 1998). También se ha mostrado su expresión en el páncreas en desarrollo y en una variedad de tejidos humanos adultos (Ikeda *et al.*, 2002; Lioubinski *et al.*, 2003). Sin embargo, los primeros ensayos de hibridación *in situ* con el fragmento de *LSox5* obtenido de la hibridación sustractiva mostraron una llamativa expresión en territorios relacionados con la generación y distribución de derivados de la cresta neural cefálica.

En la Fig. 21 mostramos un resumen de la expresión de *LSox5* en la cresta neural cefálica y en otras estructuras del embrión de pollo. La primera expresión detectable de *LSox5* aparece en el estadio embrionario HH7, y lo hace en los pliegues neurales de la región cefálica (Fig. 21, A). En cortes transversales de estos embriones se pudo comprobar que, mientras en la región más rostral la expresión de *LSox5* implica al neuroepitelio completo, en regiones posteriores, coincidiendo con el inicio de la notocorda, la señal se restringe a los bordes dorsales de los pliegues neurales (Fig. 21, B-C). También puede apreciarse en estos cortes una fuerte expresión de *LSox5* en la propia notocorda. En embriones más desarrollados (estadio HH8) la expresión de *LSox5* se hace más fuerte en los pliegues neurales, en la región en la que se localiza la cresta neural premigratoria, tal y como puede apreciarse en una hibridación *in situ* de embriones de esta misma edad con una sonda de *Slug* (Fig.21, D y E). Cuando el tubo neural se cierra, y las células de cresta neural comienzan a delaminar, la expresión de *LSox5* es compatible con la cresta neural migratoria (Fig. 21, G-I).

En estadios más avanzados, la expresión de *LSox5* va disminuyendo en la región mesencefálica del tubo neural, donde ya no se generará más cresta, mientras que esta expresión se localiza ahora siguiendo los patrones de migración bien establecidos para las células de la cresta neural cefálica (Anderson y Meier, 1981; Tosney, 1982; Lumsden *et al.*, 1991). Observamos clara expresión de *LSox5* en la corriente más rostral que invade el mesénquima retroocular, así como en las vías de migración hacia los arcos branquiales, en las vías mandibular, hioidea y faríngea. (Fig. 21, J y K).

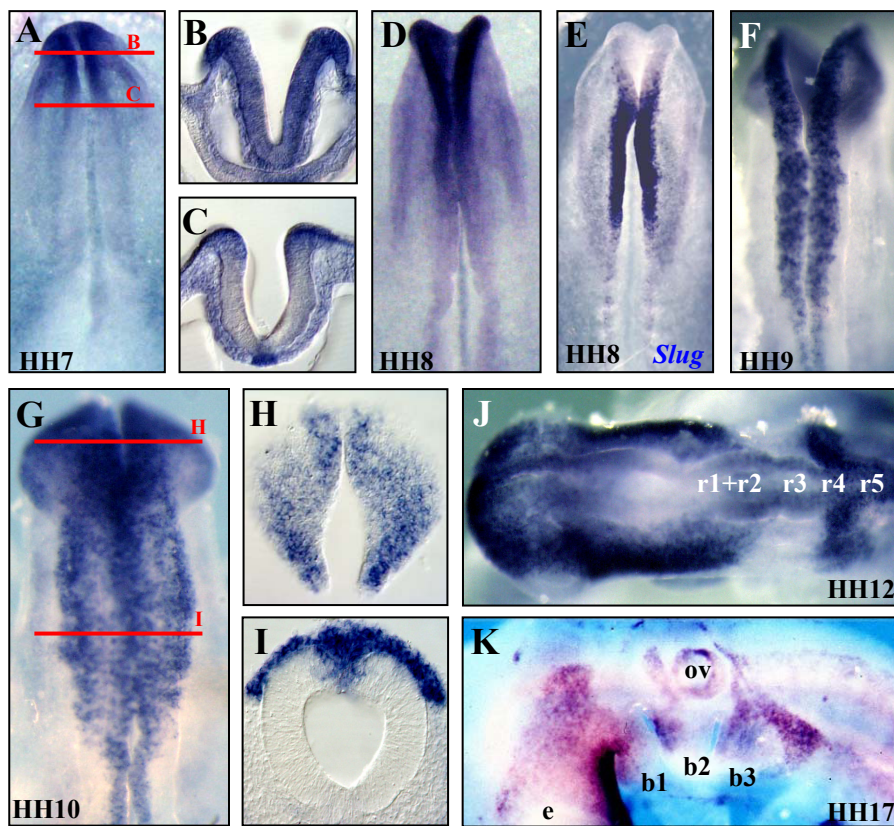


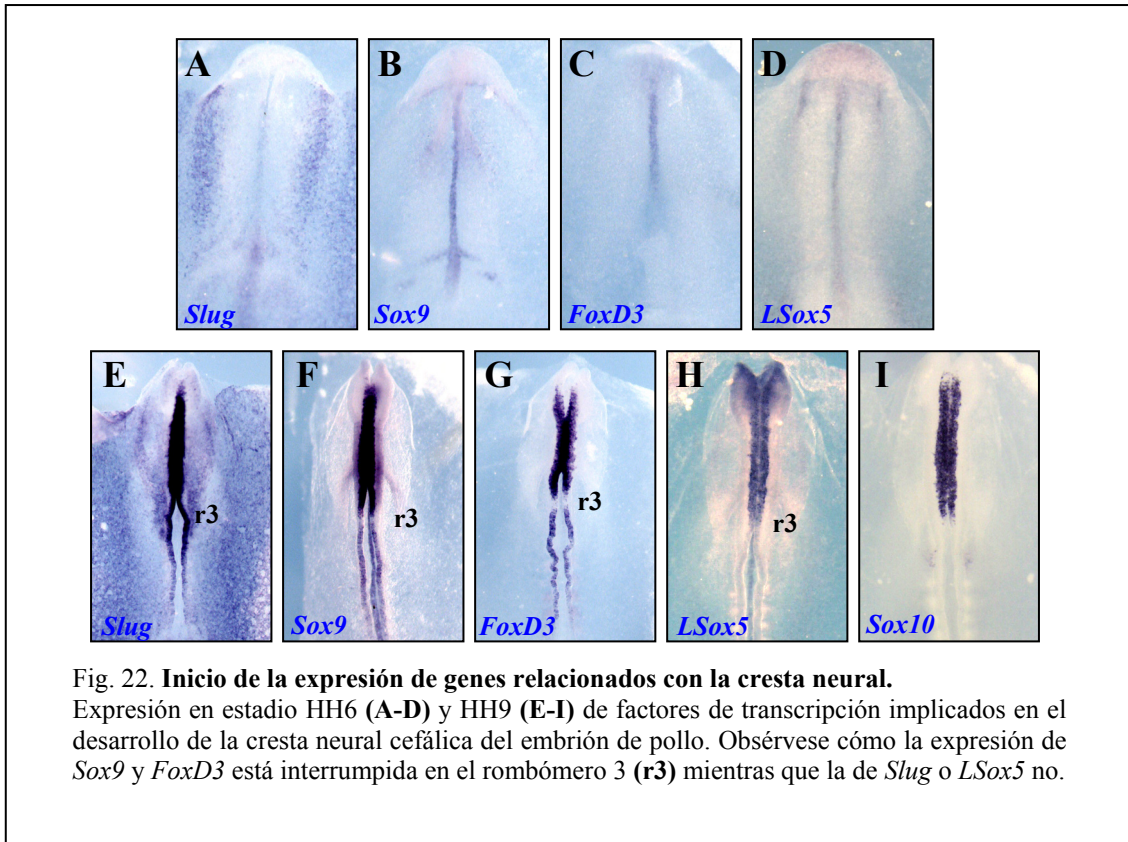
Fig. 21. Patrón de expresión de *LSox5* en embriones de pollo de estadios HH7 a HH17. Vistas dorsales de embriones de estadios HH7 (A), HH8 (D), HH9 (F), y HH10 (G) muestran la expresión de *LSox5* en el los pliegues neurales y el tubo neural dorsal, siguiendo un patrón compatible con su presencia en la cresta neural cefálica premigratoria y migratoria. Secciones transversales de embriones de estadio HH7 (B y C) y estadio HH10 (H e I), exponen cómo *LSox5* se expresa a lo largo de todo el eje dorsoventral del tubo neural a la altura del prosencéfalo (B y H), mientras que en regiones más caudales su expresión se restringe a la zona más dorsal (C e I). Una comparación con la expresión de *Slug* en un embrión de estadio HH8 (E) permite ver las zonas de producción de cresta. Una imagen dorsal de un embrión de estadio HH12 (J) muestra la expresión de *LSox5* en las vías de migración de la cresta neural originada en el mesencéfalo y los distintos rombómeros (r) del rombencéfalo. Un embrión de estadio HH17 (K) visto lateralmente indican que la expresión de *LSox5* se mantiene a medida que las células de cresta neural avanzan hacia el ojo (e) y hacia los arcos branquiales (b1-b3), esquivando la vesícula ótica (ov).

Una de las primeras cosas que observamos fue que los niveles de expresión de *LSox5* en la cresta neural troncal son mucho más bajos que en la craneal. La diferencia entre estas dos poblaciones de cresta es un hecho que se viene constatando en los últimos tiempos. Así, hay factores como *Id2* o el receptor de hialuronato *CD44* que únicamente se expresan en la cresta neural cefálica (Martinsen y Bronner-Fraser, 1998; Corbel *et al.*, 2000). A este respecto, también se han descrito importantes diferencias en cuanto al orden de aparición y relación funcional de distintos factores de transcripción con relevancia en el desarrollo de la región dorsal del tubo neural. Este es el caso de *Slug* y *Pax3*; en el que el primero precede y es capaz de inducir la expresión del segundo en la cabeza y no en el tronco (del Barrio y Nieto, 2002).

En resumen, el patrón de expresión de *LSox5* mostrado es compatible con la cresta neural cefálica premigratoria y migratoria.

5. 2. 2. Comparación del inicio de expresión de *LSox5* y otros marcadores de la cresta neural

Con el fin de poner en contexto el momento en el que *LSox5* comienza a expresarse en la región dorsal del tubo neural, comparamos embriones de estadios de desarrollo similares hibridados con distintos factores de transcripción cuya expresión se ha descrito en la cresta neural. Como puede apreciarse en la Fig. 22, la expresión de *Slug* es la primera en detectarse en los bordes de la placa neural en estadio HH6, en la zona de inducción de la cresta neural. Esta expresión es rápidamente seguida en HH7 por la de *Sox9* (Cheung y Briscoe, 2003) y *FoxD3* (Kos *et al.*, 2001). Pudimos observar también que, si bien la aparición de *Slug* precede a la de *Sox9* en los primeros estadios de desarrollo, a medida que éste progresa la diferencia se hace menos aparente, y, en el tronco, llega un momento en que la expresión de *Sox9* parece incluso preceder a la de *Slug*. *LSox5* se expresa ligeramente más tarde que estos últimos, mientras que la expresión de *Sox10* es la que más tarde comienza, restringiéndose a la cresta neural una vez ésta delamina del tubo neural e inicia la migración.



Resultan interesantes también las diferencias que encontramos en la expresión de los distintos factores a lo largo del eje rostrocaudal del embrión. Una de las más aparentes es que, mientras que *Slug* y *LSox5* se expresan en todos los rombómeros, incluido el tercero, tanto *Sox9* como *FoxD3* interrumpen su expresión en este rombómero. Aunque en menor cantidad, sí se produce cresta neural en el rombómero 3; una buena parte de ella sufre apoptosis en el propio tubo neural (Graham *et al.*, 1993), y la restante se desvía hacia los rombómeros adyacentes para migrar junto con la cresta propia de éstos (Birgbauer *et al.*, 1995). En este sentido, tanto *Slug* como *LSox5* son marcadores de cresta neural más generales que *Sox9* o *FoxD3*.

5. 2. 3. Inmunohistoquímica de LSox5 en la cresta neural

Una indicación importante sobre la bondad del suero α -A880, utilizado en los ensayos de inmunohistoquímica que se describen a continuación, la aportó la comparación de los datos de expresión obtenidos con los patrones de hibridación *in situ* obtenidos con sondas específicas de *LSox5* (Fig. 23). Aunque para certificar la correspondencia se intentó el doble marcaje de mRNA y proteína en la misma muestra, esto no fue posible porque el antígeno LSox5 no se preserva después del protocolo experimental de la hibridación *in situ*. No obstante, quedó claro en todos los casos que la señal inmunohistoquímica se restringe al núcleo de las células, tal y como es esperable para un factor de transcripción, y que no se detectaron diferencias entre los patrones definidos por ambas técnicas en los estadios de desarrollo que hemos estudiado.

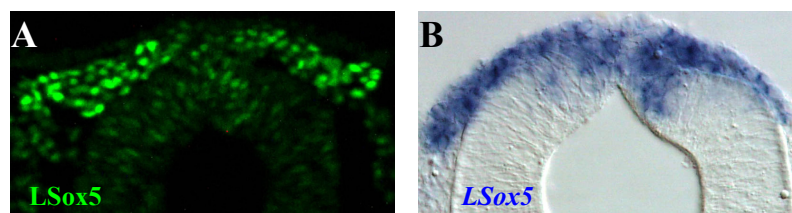
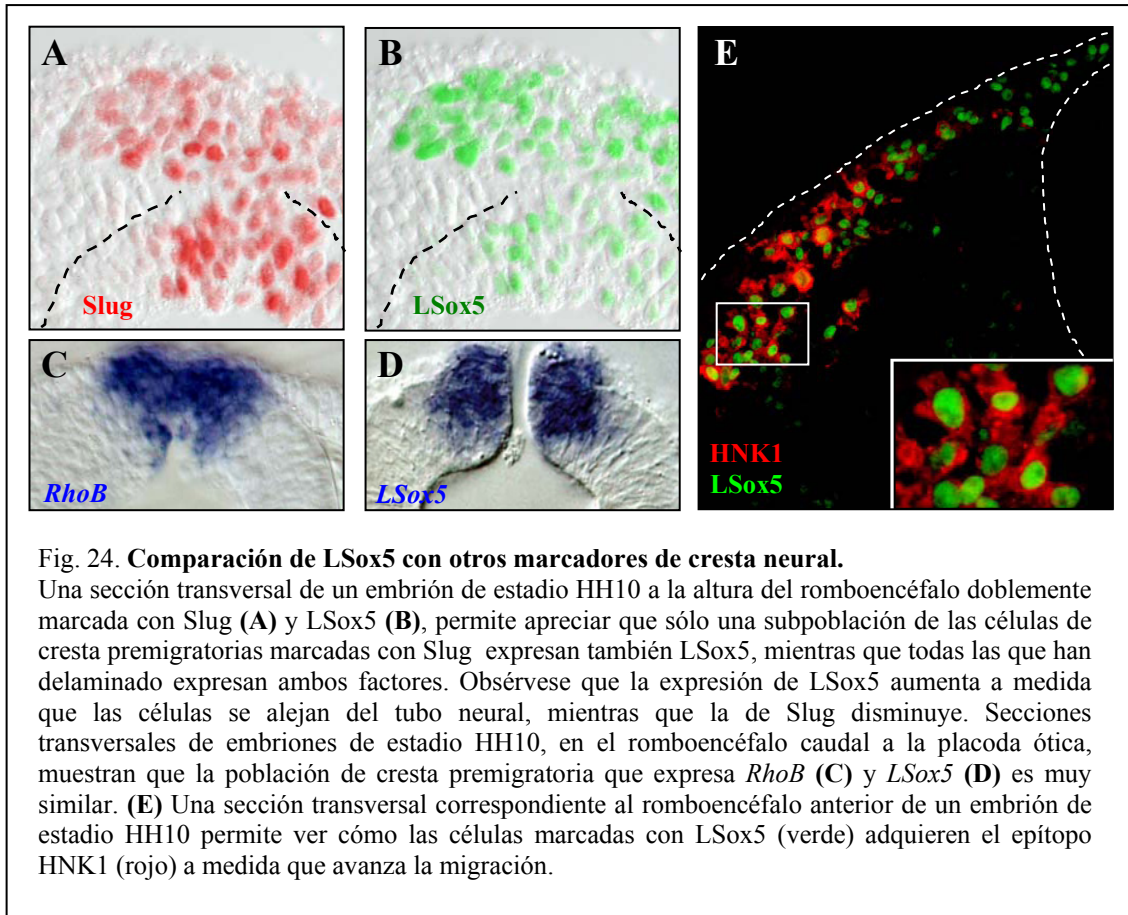


Fig. 23. **Inmunohistoquímica e hibridación *in situ* de LSox5.**
Una inmunohistoquímica (A) y una hibridación *in situ* (B) de LSox5 en cortes equivalentes de embriones de estadio HH10 mostraron que las zonas reconocidas por el anticuerpo y por la sonda contra *LSox5* eran prácticamente idénticas.

Dada la compatibilidad del patrón de expresión de LSox5 con su localización en las células de la cresta neural cefálica, y disponiendo de un suero útil para ensayos de inmunohistoquímica, pensamos que dobles marcajes con marcadores bien aceptados de cresta neural nos confirmarían este supuesto. Comenzamos con un doble marcaje de LSox5 y Slug (Fig. 24, A y B). Pudimos observar que, en la zona dorsal del tubo neural, todas las células positivas para LSox5, lo eran también para Slug, confirmando su identidad como células de cresta neural. Sin embargo, la expresión de LSox5 se restringe a una subpoblación de las células que expresan Slug dentro del tubo neural. Por el contrario, fuera del tubo neural, en la población de cresta migratoria temprana, todas las células expresan ambos

factores, y a medida que las células se van alejando en sus rutas de migración, los niveles de expresión de *LSox5* aumentan, a la vez que los de *Slug* van disminuyendo.



Estos datos, junto con los que marcan el inicio de expresión de ambos factores en la región dorsal del tubo neural, indican que, si *LSox5* participa en algún punto de la cascada de señalación conducente a la generación/delaminación de la cresta neural, éste debe estar por debajo del punto de actuación de *Slug*.

Otros marcadores bien establecidos para la cresta neural premigratoria y migratoria son la GTPasa *RhoB* y el antígeno de superficie HNK1. Además, recientemente se han descrito los patrones de expresión de estos dos marcadores en la cresta neural y su relación con la expresión de *Slug* (del Barrio y Nieto, 2004). Es por ello que a continuación estudiamos su relación con el patrón de expresión de *LSox5*.

RhoB es una GTPasa de pequeño tamaño, implicada en la delaminación de la cresta neural, y se ha determinado que se expresa con posterioridad a *Slug* en la cascada génica de inducción de cresta neural (Liu y Jessell, 1998; del Barrio y Nieto, 2002). *RhoB* se expresa en una pequeña población de la cresta neural premigratoria, justo antes de que comience su delaminación, y se sigue expresando en las fases de migración temprana. Este patrón de expresión es muy similar al de *LSox5* (Fig. 24, C y D), lo que sugiere que, al menos en estos estadios de desarrollo, podrían estarse coexpresando en las mismas células de cresta neural.

HNK1 es un epítopo de una glicoproteína de membrana (Tucker *et al.*, 1984) que se encuentra en la mayoría de las células de cresta neural migratorias, una vez éstas se encuentran a cierta distancia del tubo neural siguiendo sus rutas normales de migración (Le Dourain y Kalcheim, 1999; del Barrio y Nieto, 2004). En un doble marcaje de *LSox5* y HNK1, pudimos observar que la gran mayoría de las células de cresta neural migratoria contienen ambos epítopos (Fig. 24, E), si bien la población de cresta neural migratoria temprana expresa únicamente *LSox5*.

5. 2. 4. Expresión de *LSox5* en los precursores de las células de Schwann

En la cabeza del embrión de pollo, toda la glía periférica proviene de la cresta neural (revisado en LeDourain y Kalcheim, 1999). La población de glía periférica incluye la glía satélite de los ganglios craneales, así como las células de Schwann asociadas con los nervios craneales. Un análisis inmunohistoquímico a lo largo de diferentes estadios de desarrollo mostró que la expresión de *LSox5* se mantenía en ambos tipos de glía.

Uno de los primeros marcadores descritos en las células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes es P_0 (Bhattacharyya *et al.*, 1991). Por inmunohistoquímica, pudimos detectar la expresión más temprana de P_0 en estadio HH16, asociada al segmento proximal del nervio vestibulo-acústico,

localización en la que coincide con la expresión de LSox5 (Fig. 25, A). Más tarde detectamos la doble expresión de P₀ y LSox5 en la salida de otros nervios craneales del sistema nervioso central. En el caso del nervio oculomotor, es morfológicamente muy claro como los precursores de las células de Schwann se localizan en la salida del nervio, expresando fuertemente LSox5 en estadio HH19 antes de expresar P₀ (Fig. 25, B), el cual no aparece hasta más tarde (Fig. 25, C). En general, células que expresan fuertemente LSox5 se localizan en el recorrido de todas las fibras nerviosas que atraviesan el mesénquima cefálico, lo cual se puede poner de manifiesto mediante un doble marcaje utilizando el anticuerpo Tuj (que reconoce β -tubulina), y resulta claro que su destino diferenciativo será convertirse en células de Schwann (Fig. 25, E).

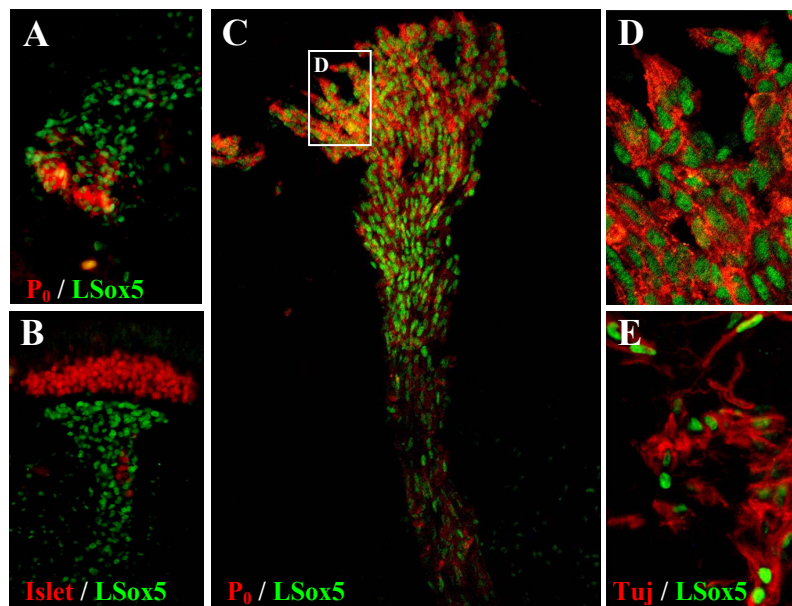


Fig. 25. Expresión de LSox5 en las células de Schwann.

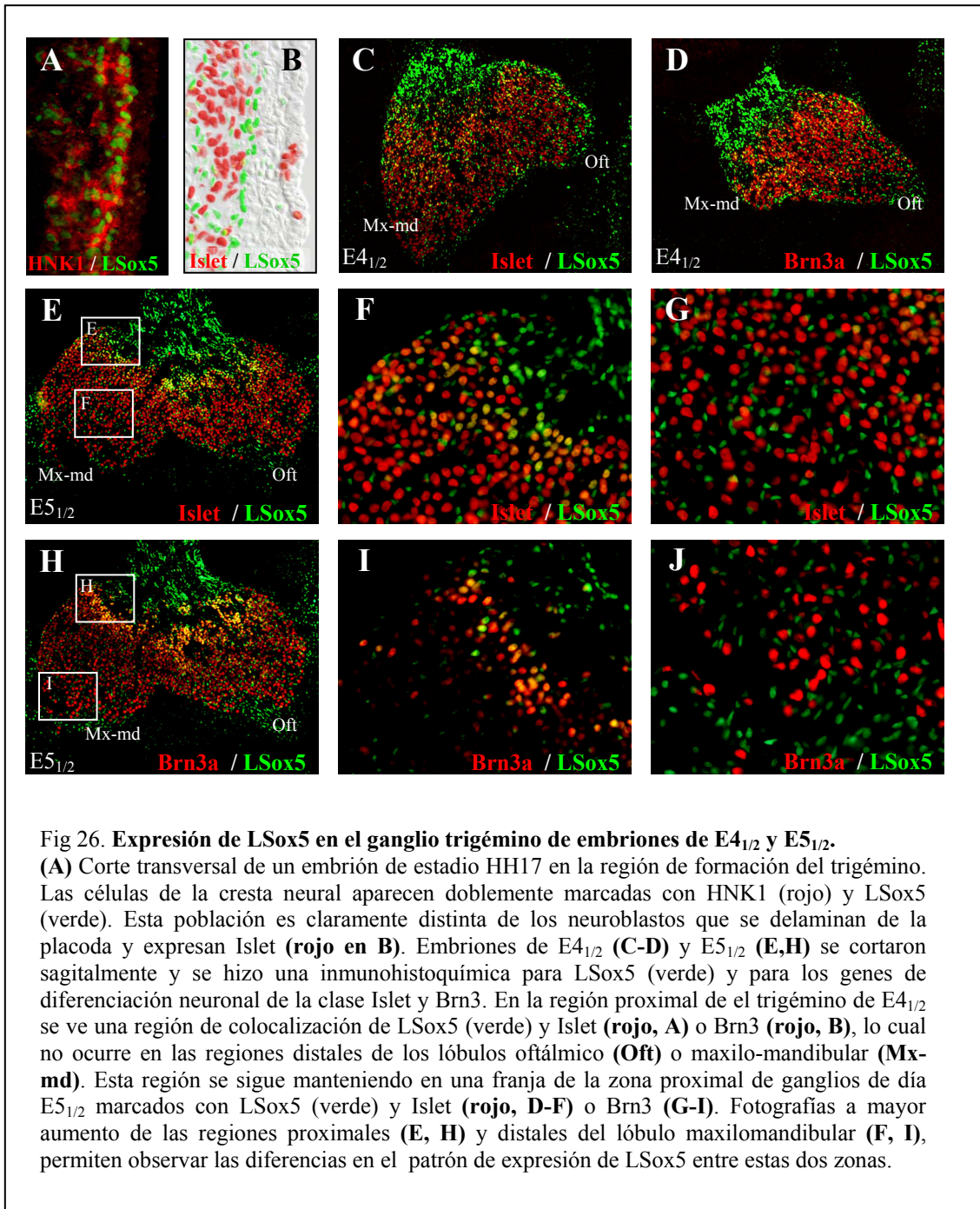
(A) Salida del nervio vestibulo-acústico en un embrión de estadio HH16, en el que se observa la primera expresión de P₀ detectable (rojo), y su coexpresión con LSox5 (verde). (B) Los núcleos marcados con Islet (rojo) identifican a las neuronas del núcleo mesencefálico del nervio oculomotor en estadio HH19, a cuya salida se han situado numerosas células que expresan LSox5 (verde). Estas células todavía no expresan P₀, pero sí lo hacen en estadio HH25 (C). Una ampliación de esta región mediante microscopía confocal (D) permite asegurar que las células coexpresan P₀ y LSox5. (E) Un marcaje con Tuj (rojo) y LSox5 (verde) muestra cómo las células que expresan LSox5 se sitúan acompañando la salida de las distintas fibras del ganglio ciliar de un embrión de estadio HH25.

5. 2. 5. Expresión de LSox5 en los ganglios craneales

Tanto por inmunohistoquímica como por hibridación *in situ* habíamos detectado una abundante expresión de *LSox5* asociada a todos los ganglios craneales, estructuras derivadas en gran medida de células de la cresta neural. Es por ello que decidimos analizar el desarrollo de diferentes ganglios para tratar de relacionar la expresión de *LSox5* con los distintos fenotipos celulares y/o establecer patrones.

Un buen modelo para este análisis lo constituye el ganglio trigémino que, como relatamos en la introducción, es un ganglio mixto con aportación de precursores neuronales de la cresta neural y de las placodas ectodérmicas. Las células procedentes de la cresta neural son las primeras en situarse en el lugar en el que se formará dicho ganglio en estadio HH12 (Covell y Noden, 1989). Aquí entran en contacto con las células que delaminan de la placoda, que son las primeras en salir de ciclo y diferenciarse en neuronas. En este proceso expresan primero factores con dominio estructural Lim, de la clase Islet, y posteriormente el factor Brn3a (Artinger *et al.*, 1998; Fedtsova *et al.*, 2003). En embriones de estadio HH17 y posteriores, se pudo apreciar que las células de la cresta neural que migran hasta la región adyacente a la placoda del trigémino expresan LSox5 junto con HNK1 (Fig. 26, A). Por el contrario, los neuroblastos procedentes de la placoda, que expresan Islet, constituyen una población claramente diferente (Fig. 26, B). En estudios morfológicos clásicos (D'Amico-Martel y Noden, 1980; Narayanan y Narayanan, 1980; Ayer-Le Lièvre y Le Douarin, 1982) se estableció que los neuroblastos derivados de la placoda se diferencian a lo largo del período comprendido entre los estadios HH12 y HH26 (E4_{1/2}), además de situarse específicamente en las regiones distales del ganglio, los lóbulos maxilomandibular y oftálmico. Posteriormente, entre los días de desarrollo embrionario E4 y E7, se diferencian las neuronas provenientes de la cresta neural en las regiones proximales del ganglio, donde forman un gradiente de diferenciación distal-proximal. De forma congruente con esta descripción, pudimos observar que los neuroblastos de las regiones distales (células que expresan tanto Islet como Brn3a) no

expresan LSox5. En esta región del ganglio, sólo células con núcleos morfológicamente muy diferentes, alargados y más pequeños, que corresponden a la glía periférica, expresan altos niveles de LSox5 (Fig. 26, G y J).



Por el contrario, en la región proximal del ganglio en embriones de E4_{1/2}, sí detectamos una pequeña región de coexpresión de LSox5 con Islet

y con Brn3a (Fig. 26, C y D). Asimismo, en los ganglios de día de desarrollo E5_{1/2}, pudimos comprobar que el número de células que coexpresaban LSox5 y factores de diferenciación neuronal se mantenía en una proporción similar, y siempre se localizaban en la región proximal (Fig. 26, D y G). Esto parece apoyar la idea de que la expresión de LSox5 se mantiene en precursores indiferenciados de la cresta neural cuando estos han llegado a su destino final en el ganglio trigémino, pero que ésta desaparece progresivamente a medida que las células se diferencian en neuronas. De esta forma, se establece un gradiente inverso de expresión local de LSox5 y los factores de diferenciación neuronal.

En el ganglio ciliar, cuyas neuronas maduras no son sensoriales sino motoras, y cuyos precursores provienen casi exclusivamente de la cresta neural, la situación es bien distinta. Hemos comprobado que, aunque los neuroblastos comienzan a diferenciarse y a expresar Islet en estadio HH19-20, en ningún momento se detecta expresión de Brn3a en los mismos (Fig. 27, A y B). Además tampoco hemos detectado ninguna célula doblemente marcada para Islet y LSox5 (Fig. 27, C). En todos los casos la expresión de LSox5 se restringe a la glía satélite, por lo que los precursores neuronales deben dejar de expresar LSox5 en algún momento de la migración antes de su llegada al lugar de condensación del ganglio.

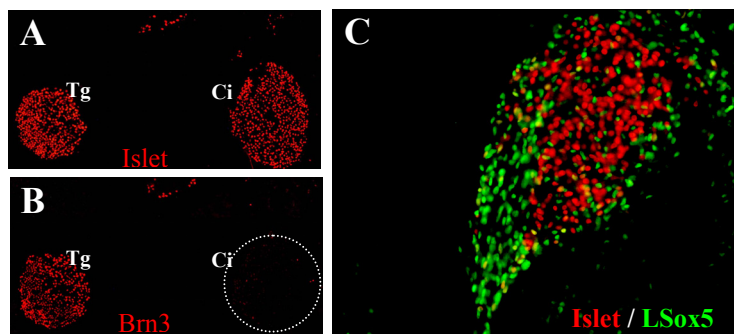


Fig. 27. Expresión de LSox5 en el ganglio ciliar de E4_{1/2}.

Las neuronas del ganglio ciliar (Ci) provienen casi exclusivamente de la cresta neural, y al ser de tipo simpático, expresan Islet (A) pero no Brn3 (B). (C) LSox5 (verde) se restringe a la glía satélite, y no colocaliza con Islet en el sitio de agregación del ciliar. Tg, ganglio trigémino.

En el ganglio vestibuloacústico todos los neuroblastos tienen su origen en la placoda auditiva. Estos precursores se delaminan de la región más ventral de la vesícula ótica, precisamente de una región que no expresa LSox5 (sí lo hace en la región más dorsal), y no hemos detectado expresión de LSox5 en ningún caso (Fig. 28, A y B, va). Por el contrario, en el ganglio geniculado, en el que supuestamente todas las neuronas provienen de las placodas epibranchiales, sí que se detectó coexpresión de Islet y LSox5 en un grupo de células (Fig. 28, A, gen), mientras que Brn3a no colocaliza con LSox5 (Fig. 28, B). En este caso parece volverse a establecer un gradiente inverso entre la expresión de LSox5 y la diferenciación de las neuronas sensoriales, aunque la procedencia de los precursores es placodal. En los otros ganglios distales, petroso y nodoso, cuyos neuroblastos también proceden de las placodas no hemos detectado dobles marcajes de LSox5 con factores de diferenciación neuronal.

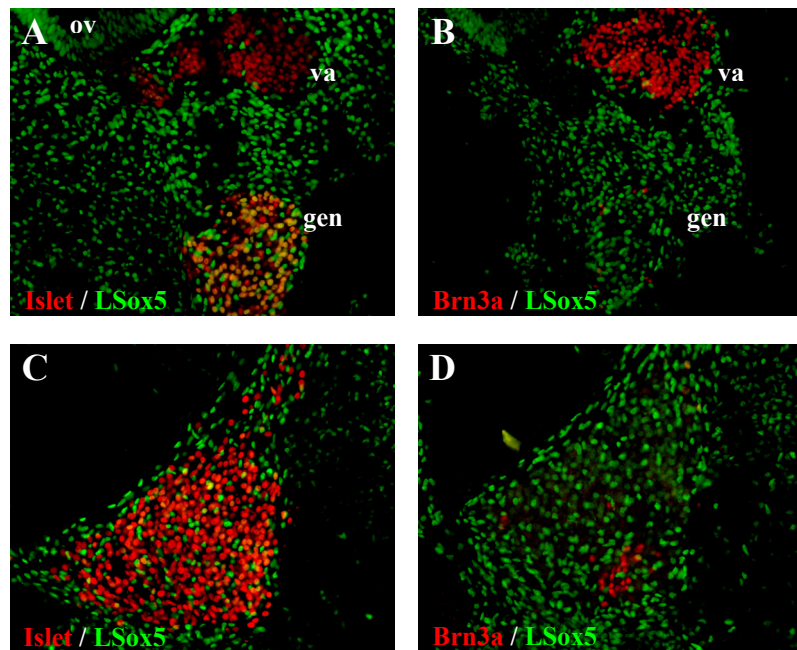


Fig. 28. Expresión de LSox5 en los ganglios de los nervios VII-IX de E5_{1/2}.

(A) LSox5 no colocaliza con los neuroblastos que expresan Islet en el ganglio vestibuloacústico (va), pero sí con los del ganglio geniculado (gen). (B) En el ganglio geniculado de esta edad todavía hay muy pocas células expresando Brn3a, pero se ve que ninguna tiene coexpresión de LSox5. En el ganglio petroso, LSox5 no colocaliza ni con Islet (C), ni con Brn3a (D).

En definitiva, queda claro que en todos los ganglios las células de la glía periférica, procedentes de la cresta neural, expresan altos niveles de LSox5 durante su diferenciación. En el caso de los precursores neuronales, la expresión de LSox5 es muy variable y no parece tener relación con la procedencia embrionaria de las células. Es posible que la expresión dependa del tipo neuronal final de las mismas, pero la resolución de este problema requerirá un estudio más detallado con otros marcadores específicos.

5. 2. 6. Expresión de LSox5 en el sistema nervioso central

Hemos detectado expresión específica de LSox5 en diferentes estructuras del sistema nervioso central. En primer lugar, hemos encontrado una expresión en la placa del suelo que, si bien es menos intensa que la de la región dorsal del tubo neural (asociada con la cresta premigratoria), está bien delimitada y presenta un gradiente antero-posterior asociado al desarrollo del tubo neural (Fig. 29, A). Ya hemos descrito la aparición de LSox5 en los pliegues neurales más rostrales de los embriones de estadio HH7 (Fig. 21, B). Esta expresión se mantiene posteriormente en toda la región prosencefálica en estructuras del telencéfalo, el diencefalo rostral y su conexión con la neuroretina, el tallo óptico (Fig. 29, B y D).

Otra región del sistema nervioso central donde la expresión de LSox5 presenta aspectos interesantes es la retina (Fig. 29, C). La expresión es muy intensa en todas las células del epitelio pigmentario, desde estadios coincidentes con el comienzo de la pigmentación de las mismas (HH19-20). Asimismo hemos detectado LSox5 en algunas células de la capa de células ganglionares de la retina neural, células dispersas cuyo número no parece aumentar con el desarrollo. Por el contrario, asociadas a la región de salida del nervio óptico, un grupo de células, cuyo número sí va aumentando con el desarrollo, expresa niveles altos de LSox5. En esta región se forma más adelante en el desarrollo una estructura especializada y altamente vascularizada llamada pecten.

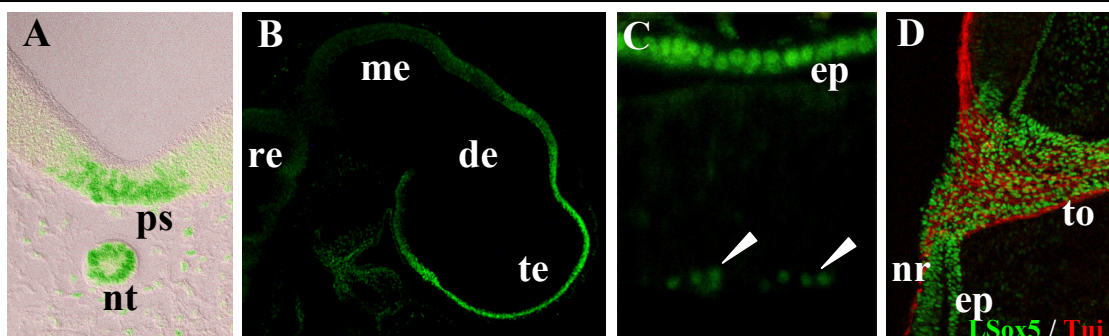


Fig. 29. **Expresión de LSox5 en otras estructuras del sistema nervioso central.**

(A) Un corte transversal de un embrión de estadio HH18 muestra la expresión de LSox5 en la placa del suelo (**ps**) del tubo neural. Obsérvese también el alto nivel de expresión en la notocorda (**nt**). (B) Un corte parasagital de un embrión de estadio HH16 muestra la expresión de LSox5 en el diencéfalo rostral (**de**), así como en el telencéfalo (**te**). (**me**) mesencéfalo; (**re**) rombencéfalo. (C) Una vista ampliada de la retina permite observar la fuerte expresión de LSox5 en el epitelio pigmentario (**ep**), así como en la capa de células ganglionares (flechas). (D) En un embrión de estadio HH20 se puede ver la salida del tallo óptico (**to**), donde Tuj marca los axones que discurren por el mismo y que salen de la retina (**nr**).

5. 3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LSox5 EN LA CRESTA NEURAL CEFÁLICA

La expresión persistente de LSox5 en la cresta neural desde el momento de su generación en la región dorsal del tubo neural hasta la diferenciación de algunos de sus derivados, hace pensar que este factor de transcripción puede estar implicado en diferentes procesos del desarrollo de esta población celular. El inicio de su expresión en la cresta premigratoria, por detrás de otros factores vinculados a la segregación de la misma del resto de precursores neuroepiteliales, relacionan su posible función con procesos que han de ser posteriores a esta decisión de desarrollo.

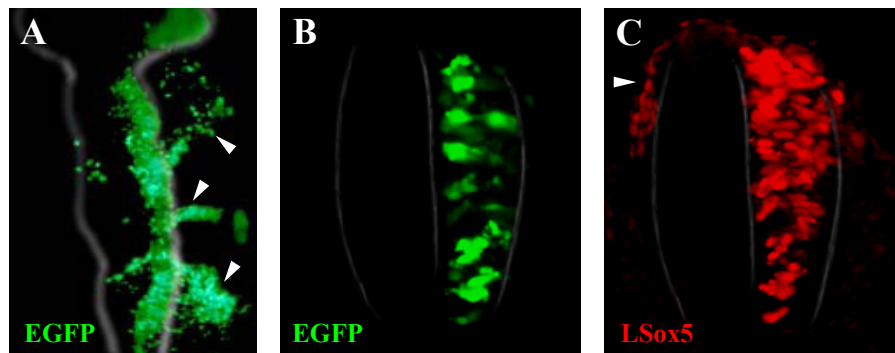


Fig. 30. Co-electroporación de pCX-LSox5 y pCX-EGFP.

(A) Un embrión electroporado muestra células con expresión de EGFP en el lado derecho del tubo neural y en las vías de migración de cresta neural que salen del mismo (**flechas**). En un corte transversal la expresión de EGFP marca el lado del tubo neural electroporado (B), y una inmunohistoquímica revela los altos niveles de LSox5 que se alcanzan (C). Compárese con las células de cresta neural que migran a partir del lado no transfectedo, y que muestran la expresión endógena de LSox5 (**flecha**).

En la relación de experimentos que se citan a continuación se ha buscado interferir con la función normal de LSox5 mediante la sobreexpresión de este factor en el tubo neural, aumentando los niveles de las células que de forma natural lo expresan en la región más dorsal y extendiendo el dominio de expresión hacia regiones más ventrales. Para ello se indujo la expresión de la forma LSox5-II en el lado derecho del pliegue neural/tubo neural mediante la electroporación del plásmido pCX-LSox5 en embriones de estadios HH8-9. El plásmido pCX-EGFP, que induce la

expresión la proteína fluorescente EGFP, fue coelectroporado para poder identificar con facilidad las células transfectadas. Transcurridas 20 horas después de la electroporación, se puede observar un marcaje bastante uniforme de EGFP en el lado derecho del tubo neural de los embriones tratados, así como en las vías de migración de cresta neural que partían de dicho lado (Fig. 30, A). Por inmunohistoquímica, se comprobó que las células que contenían EGFP expresaban igualmente altos niveles de LSox5 (Fig. 30, B y C).

5. 3. 1. La sobre-expresión de LSox5 en el tubo neural cefálico produce un aumento de la población de células marcadas con HNK1

Como primera aproximación analizamos la expresión del epítipo HNK1, considerado un marcador general de cresta neural, en los embriones electroporados. Se observó un aumento generalizado de las células marcadas con HNK1 en el lado electroporado, tanto en regiones ectópicas del tubo neural como a lo largo de las vías de migración normal de la cresta neural. Aunque pudimos observar un efecto similar a lo largo del eje antero-posterior, el aumento de HNK1 resultó en especial evidente en las rutas de migración de cresta que rodean la vesícula ótica (Fig. 31, A y B). En cortes transversales de estos embriones, pudimos apreciar tres efectos diferentes de la electroporación sobre la expresión de HNK1: a) las células marcadas con HNK1 ocupan una superficie mayor en el lado electroporado, dato compatible con que haya más células HNK1⁺ en este lado (Fig. 31, C); b) hay células HNK1⁺ adicionales en posiciones más retrasadas en el lado electroporado, hecho compatible con un aumento del período de generación de cresta en ese lado, y c) que la expresión de HNK1 en la cresta migratoria del lado electroporado se observa en posiciones muy cercanas al tubo neural (Fig. 31, D-E), en cresta migratoria muy temprana donde nunca se expresa HNK1 en condiciones normales (del Barrio y Nieto, 2004).

De hecho, otro fenotipo llamativo de los embriones electroporados es la aparición de células HNK1⁺ dentro del tubo neural. Estas células, que tienen un aspecto epitelial, se observan en regiones intermedias y ventrales del tubo, mientras que no se detecta expresión alguna de este epítipo en el tubo neural del lado control (Fig. 31, E).

Ninguno de los efectos descritos se observa cuando se electropora exclusivamente el plásmido control pCX-EGFP.

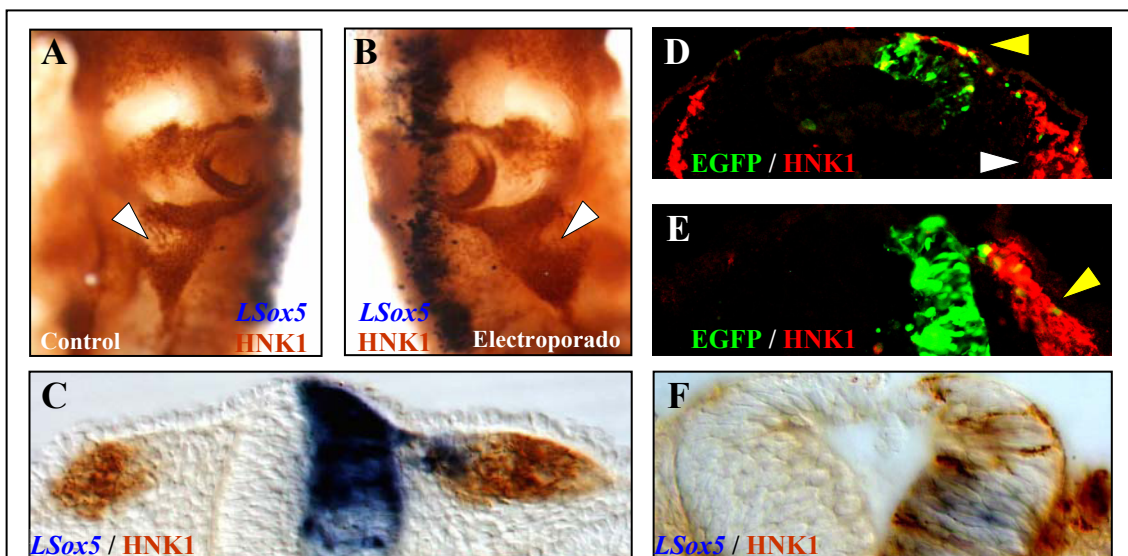


Fig. 31. La sobre-expresión de LSox5 en la región craneal del tubo neural aumenta la población de células que expresan HNK1.

(A-B) Vistas laterales de un embrión analizado para la expresión del *LSox5* electroporado (azul) y HNK1 (marrón). El incremento en el número de células marcadas con HNK1 es particularmente obvio en la vía circumfaríngea de migración de cresta neural (A-B, flechas) en el lado transfectado (B). (C) Una sección transversal a la altura del rombencéfalo posterior muestra la mayor cantidad de células con marcaje de HNK1 que se observa en el lado electroporado. (D-E) Algunas células con tinción de HNK1 aparecen en posiciones retrasadas en las vías de migración de cresta (D-E, flechas amarillas). (F) Un corte transversal a la altura del romboencéfalo caudal a la vesícula ótica muestra la aparición de numerosas células marcadas con HNK1 dentro del lado transfectado del tubo neural. En todos los casos la señal de la hibridación in situ de *LSox5* se dejó progresar el mínimo tiempo necesario para poder ver los niveles de sobre-expresión más altos, y por tanto no se aprecian los niveles de expresión endógenos o los de sobre-expresión más bajos.

5. 3. 2. La sobre-expresión de LSox5 en el tubo neural cefálico produce un aumento de la expresión de *FoxD3* y *Sox10*, característicos de los derivados no neurales de la cresta neural

Quisimos comprobar si las células HNK1⁺ adicionales producidas por la sobre-expresión de LSox5 expresaban otros marcadores de cresta neural, y probamos los factores *FoxD3* y *Sox10*, que se expresan en cresta cefálica migrante y que han sido implicados tanto en la propia generación de la cresta neural como en la posterior especificación de fenotipos no neurales derivados de la misma (Aoki *et al.*, 2003; Britsch *et al.*, 2001; Dottori *et al.*, 2001; Kos *et al.*, 2001).

En los embriones electroporados con pCX-LSox5, pudimos observar un aumento generalizado de células que expresaban *Sox10* (Fig. 32, A-B) y *FoxD3* (Fig. 32, E-F) en posiciones similares a las observadas con HNK1. Nuevamente, el aumento de dichas poblaciones celulares era particularmente evidente en la vía de migración de cresta neural circumfaríngea, y se observaron numerosas células adicionales en fases tempranas de la migración (Fig. 32, D y H). Estos embriones, que habían alcanzado ya estadios de desarrollo en torno a HH13 y HH14, mostraban también células adicionales marcadas con *FoxD3* y *Sox10* saliendo del mesencéfalo y el rombencéfalo anterior, a pesar de que la producción de cresta neural cesa en dichos sitios generalmente a partir del estadio HH11. Así, en cortes transversales a la altura del mesencéfalo se pudieron observar células de cresta neural que expresaban *Sox10* (Fig. 32, C) y *FoxD3* (Fig. 32, G), migrando en posiciones muy retrasadas respecto al lado control. Este resultado indica que la capacidad de generación de cresta neural se había extendido temporalmente tras la expresión ectópica de LSox5.

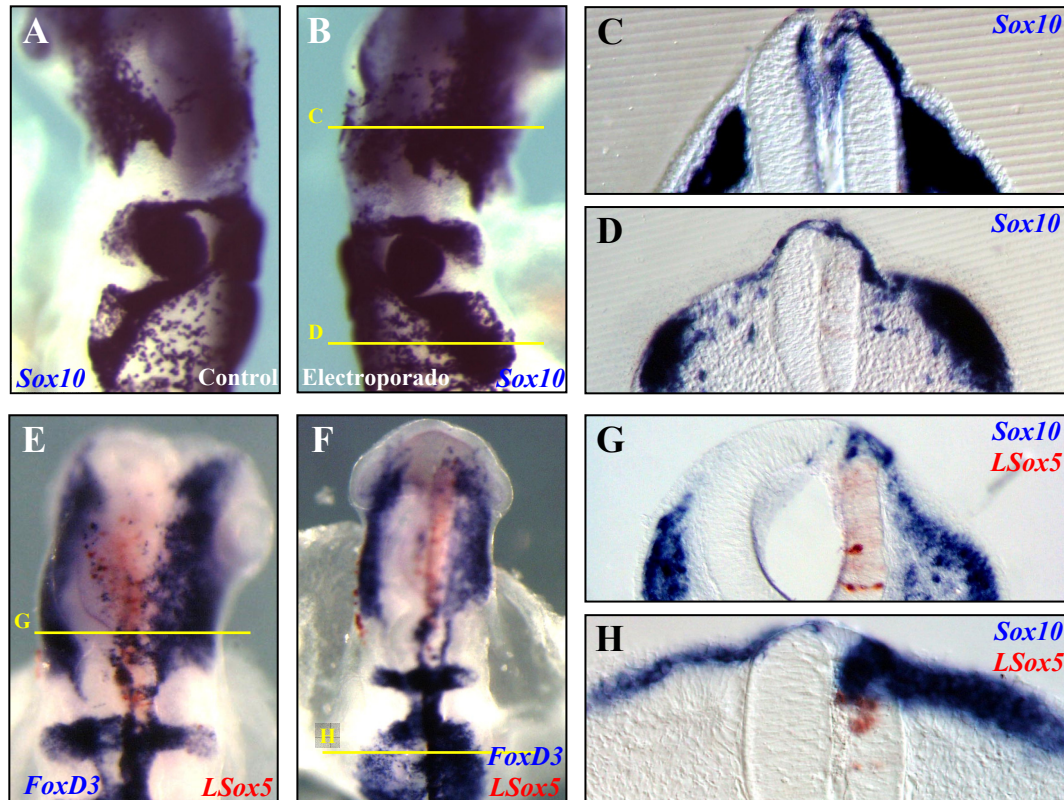
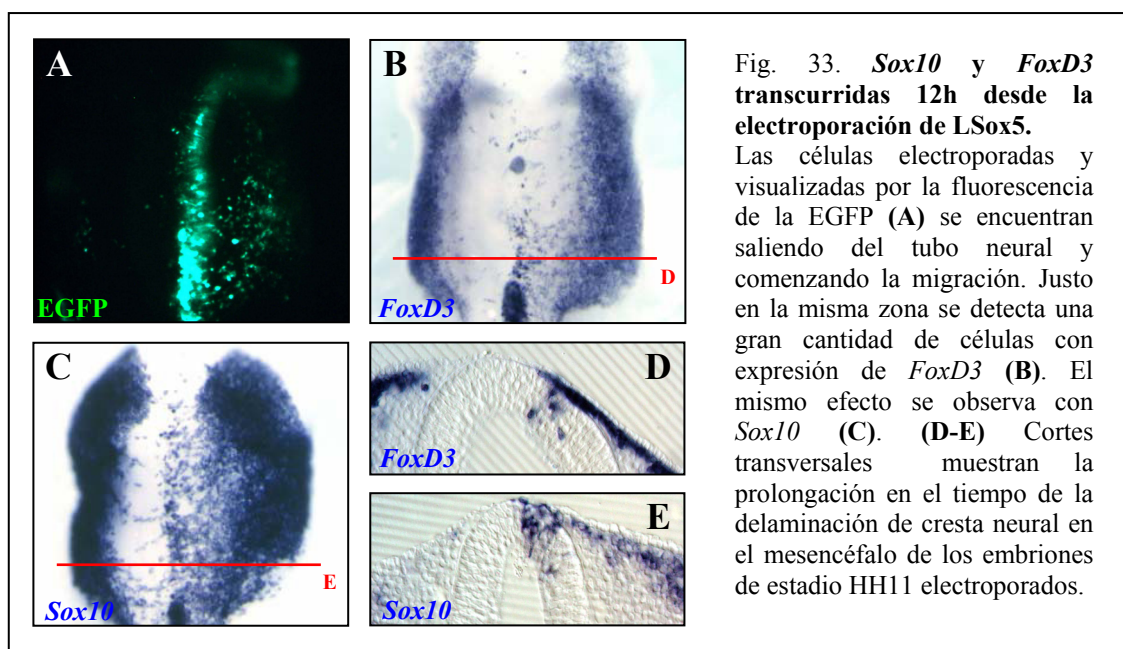


Fig. 32. La sobre-expresión de LSox5 aumenta la expresión de Sox10 y FoxD3.

(A-B) Vistas laterales de un embrión electroporado en el que se ha hecho una hibridación *in situ* para Sox10. (C) En un corte transversal se puede apreciar la gran cantidad de células que expresan Sox10 y se encuentran saliendo del mesencéfalo. (D) Otro corte a la altura del rombencéfalo caudal muestra el mayor número de células presentes a lo largo de la vía glossofaríngea de migración. (E-F) Dos embriones electroporados que muestran un claro aumento del número de células que expresan FoxD3, lo que se puede apreciar en cortes transversales, tanto a la altura del mesencéfalo (G), como en regiones post-óticas del rombencéfalo (H).

El fenómeno de aumento de la competencia temporal de producción de cresta neural en el mesencéfalo y el rombencéfalo anterior se aprecia incluso con mayor claridad tan sólo 12 horas después de la transfección. En estas condiciones, los embriones llegan hasta estadios de desarrollo HH11 o HH11⁺, momento en el que la generación de cresta neural en el mesencéfalo y rombencéfalo anterior concluye normalmente, y las células de cresta neural generadas en dichos lugares han migrado a una cierta distancia del tubo neural. Así se observó en el lado control de los embriones electroporados, mientras que en el lado transfectado con LSox5 encontramos numerosas células todavía delaminando del tubo neural y comenzando a migrar, y que expresaban FoxD3 (Fig. 33, B) y Sox10 (Fig. 33, C).

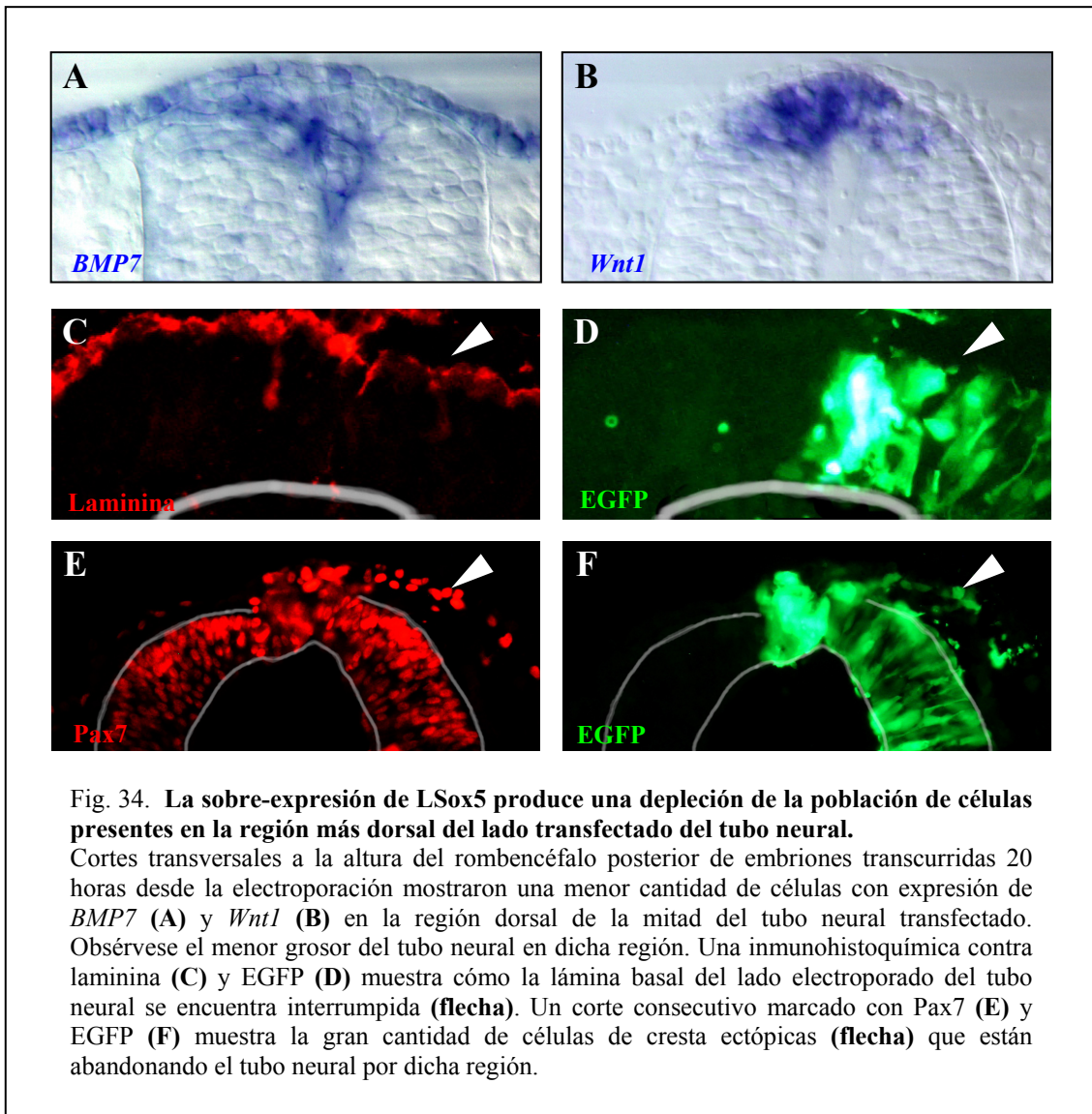
Tampoco ninguno de los fenotipos anteriores fue observado cuando se electroporaron los embriones con pCX-EGFP sólo.



5. 3. 3. El aumento en la producción de cresta neural provocado por la sobre-expresión de L*Sox5* no parece estar mediado por factores solubles de las familias BMP o Wnt

Nos preguntamos si la sobreproducción de de cresta neural producida por la sobre-expresión de L*Sox5* podía deberse a la activación de genes especificadores de la cresta neural. Este papel se le ha atribuido a factores solubles de las familias BMP (Marchant *et al.*, 1998; Sela-Donenfeld y Kalcheim, 1999; Liem *et al.*, 1995) y Wnt (Villanueva *et al.*, 2002; García-Castro *et al.*, 2002; Ikeya *et al.*, 1997), entre otros. Analizamos, por tanto, la expresión de los factores de estas familias que se han relacionado con la generación de cresta neural en el embrión de pollo (BMP4, BMP7 y Wnt1) en los embriones electroporados. El resultado fue que no pudimos detectar inducción alguna de la expresión de estos factores causada por la sobre-expresión de L*Sox5*. Por el contrario, en algunas regiones se detectó incluso una disminución de los niveles de expresión de los mismos (Fig 34, A-B), lo

que se debe simplemente a la reducción del número de células remanentes en la región dorsal del lado electroporado con pCX-LSox5. Esta reducción es morfológicamente bien visible en las regiones en las que la electroporación ha causado una salida masiva de células de cresta, lo cual puede detectarse por el marcaje de laminina, que muestra cómo la lámina basal del tubo neural se encuentra interrumpida en el lado electroporado (Fig. 34, B-C). Así, parece que la sobreproducción de cresta neural se produce a expensas de otros fenotipos neuronales del sistema nervioso central.



La reducción del número de células precursoras de neuronas del sistema nervioso central, que es apreciable morfológicamente, nos llevó a preguntarnos por el efecto que la sobre-expresión de LSox5 tendría sobre el

factor de transcripción Pax7. Este factor se expresa en el tercio dorsal del tubo neural y, en la zona del tronco, desaparece inmediatamente de las células de cresta cuando inician la migración. De hecho, en condiciones experimentales en las que se ha producido un exceso de generación de cresta por sobre-expresión de Sox9 (Cheung y Briscoe, 2003), se ha visto una clara disminución de Pax7 en el tubo neural troncal. A diferencia de lo que sucede en el tronco, muchas células de la cresta neural cefálica mantienen la expresión de Pax7 durante la migración hasta su destino final en el mesénquima retroocular y en los arcos branquiales (Kawakami *et al.*, 1997; Mansouri *et al.*, 1996). En nuestro sistema experimental, la generación forzada de cresta neural cefálica no produjo la disminución de Pax7 en el tubo, sino todo lo contrario, un claro aumento de la expresión de Pax7 tanto en el tubo neural como en la población de cresta migrante, en las mismas regiones en las que se pudo constatar la rotura de la lámina basal (Fig. 34, E-F)

5. 3. 4. La sobre-expresión de LSox5 afecta al mecanismo de delaminación de la cresta neural

Los resultados presentados hasta este punto, tanto referentes al inicio de la expresión de LSox5 posterior al de otros factores implicados en la generación de cresta neural, como a los efectos producidos por la sobre-expresión de LSox5, dirigen el foco de atención al proceso de delaminación de la cresta neural. Decidimos, por tanto, analizar la respuesta de factores relacionados con la transición epitelio-mesénquima (TEM). Slug se ha descrito como inductor primario de la TEM (Nieto *et al.*, 1994; del Barrio y Nieto, 2002), al activar una cascada de señalización que conduce a la expresión de la GTPasa RhoB (Liu y Jessell, 1998; del Barrio y Nieto, 2002), y a cambios en la dotación de proteínas de adhesión en la membrana [desaparición de N-cadherina y cadherina-6B, aparición de cadherina-7] (Nakagawa y Takeichi, 1995; Nakagawa y Takeichi, 1998).

Cuando analizamos la expresión de *Slug*, *RhoB* y *N-cadherina* en embriones después de 20 horas de la electroporación de pCX-LSox5,

podimos observar que el dominio dorsal de delaminación, definido por el dominio de expresión de *Slug* y *RhoB*, y por la ausencia de expresión de *N-cadherina*, se había expandido hacia posiciones más mediales del lado transfectado del tubo neural cefálico (Fig. 35, A-C). En este dominio expandido, se pueden observar numerosas células abandonando el tubo neural, y la lámina basal del tubo neural presentaba discontinuidades que son visibles morfológicamente (Fig. 35, I, flechas).

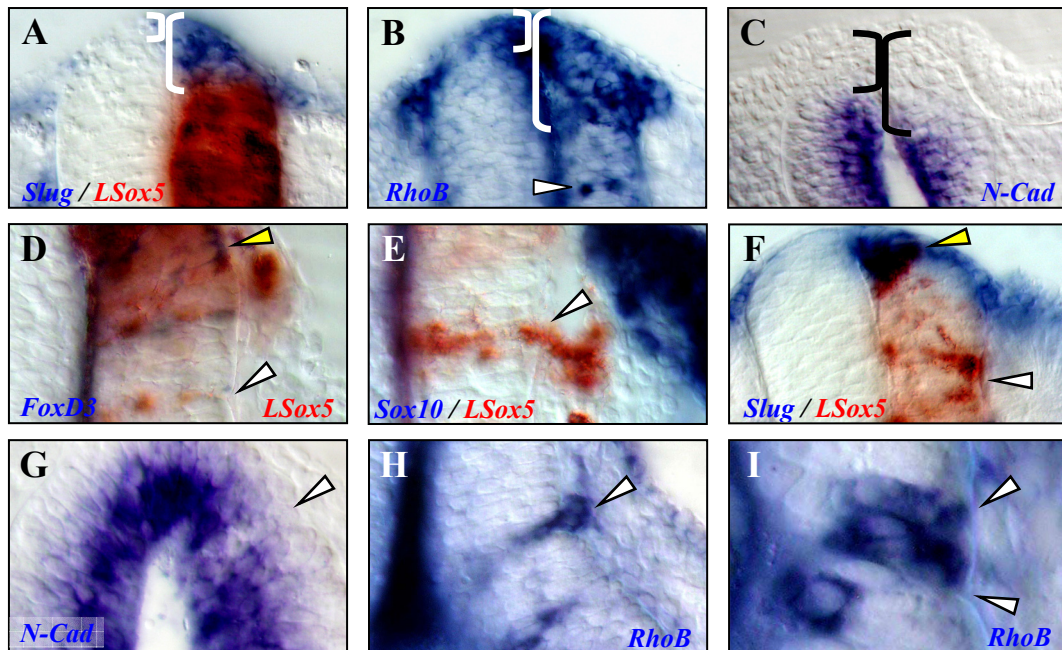


Fig. 35. La sobre-expresión de *LSox5* induce una mayor delaminación de células de cresta neural en la región dorsal del tubo neural cefálico y expresión ectópica de *RhoB*.

Aumento del dominio dorsal de delaminación en el lado transfectado del tubo neural cefálico, tal y como se puede ver por la expresión de *Slug* (A), *RhoB* (B) y *N-cadherina* (C). Obsérvese la aparición de células ectópicas expresando *RhoB* (B, flecha). En regiones mediales del tubo neural aparecen células con sobre-expresión de *LSox5* que están rompiendo la lámina basal, y que no expresan *FoxD3*, *Sox10* ni *Slug* (D, E y F, flechas blancas). Comparar con las células ectópicas que coexpresan *LSox5* y *FoxD3* (D, flecha amarilla), o *LSox5* y *Slug* (F, flecha amarilla) en el dominio dorsal, competente para la formación de cresta neural. Las células que delaminan por regiones mediales del tubo neural pierden la expresión de *N-cadherina* (G, flecha), y expresan *RhoB* (H-I, flechas). Obsérvese la similitud entre las células que han perdido la *N-cadherina* y las que expresan *RhoB* en cortes transversales del mesencéfalo de dos embriones electroporados (G, H).

Otro efecto que hemos observado en los embriones electroporados ha sido la aparición de algunas células que se delaminan del tubo neural y se incorporan al mesénquima adyacente por posiciones anormalmente mediales e incluso ventrales. La continuidad de la lámina basal del tubo se

encuentra interrumpida en estos puntos (Fig. 35, D-F, flechas), y las células están electroporadas como lo muestra la clara sobre-expresión de LSox5. Al analizar marcadores relacionados con la TEM, también comprobamos la existencia en el lado electroporado de células diseminadas en zonas ectópicas que expresan *RhoB* y son capaces de abandonar el tubo neural (Fig. 35, H e I), así como regiones discretas en las que no hay expresión de *N-cadherina* (Fig 35, G).

Por lo tanto, la sobre-expresión de LSox5 en el tubo neural cefálico era capaz de extender la zona competente para la formación y delaminación de cresta neural. Las células que abandonan el tubo neural a partir de esta región expresan genes característicos de la cresta neural, tales como *Slug*, *RhoB*, *FoxD3*, *Sox10* y *Pax7*, y pierden la expresión de *N-cadherina*. En regiones más mediales, la sobre-expresión de LSox5 induce la expresión ectópica de *RhoB* en células dispersas, que pueden romper la lámina basal y abandonar el tubo neural, pero que no expresan otros marcadores de cresta neural.

5. 3. 5. La inducción de *RhoB* es una respuesta inmediata a la sobre-expresión de LSox5 en el tubo neural cefálico

Bajo circunstancias normales, *Slug*, que es considerado un primer inductor de la TEM, comienza a expresarse antes que *LSox5* en las zonas de generación de cresta neural. Por ello, el aumento en la expresión de *Slug* que se observa tras la sobre-expresión de LSox5 (Fig. 36, A) podemos interpretarlo como un mecanismo de retroalimentación. Sin embargo, la inducción ectópica de *RhoB* que hemos descrito en el apartado anterior nos indujo a un análisis más estrecho de la relación entre estos dos factores. En concreto a un análisis más cuidadoso de la cinética de inducción de *RhoB*.

Ya a las 6-7 horas después de la electroporación se detectan las primeras células que, mediante inmunohistoquímica, revelan la expresión de EGFP y LSox5 ectópico en el lado del tubo neural transfectado (Fig. 36, A y B). En estos embriones, se pudo detectar asimismo la expresión

ectópica de *RhoB* en células dispersas a lo largo de todo el eje dorso ventral del lado electroporado del tubo neural (Fig. 36, C). En estas mismas condiciones, no se detectó la expresión anormal de *Slug* (no se muestra). Además hemos podido demostrar que las células que expresan *RhoB* de forma ectópica son precisamente aquellas primeras células en sobreexpresar *LSox5* (Fig. 36, D-F). Esto sugiere fuertemente que *RhoB* se induce por la expresión ectópica de *LSox5* de forma bastante directa. Nunca se encontraron células con expresión de *RhoB* en los embriones electroporados sólo con pCX-EGFP, ni tampoco en el lado control del tubo neural de embriones electroporados con pCX-*LSox5*. Curiosamente, la inducción parecía transitoria en las regiones intermedia y ventral del tubo neural, ya que transcurridas 12 horas desde la electroporación, sólo una pequeña parte de las células que se encontraban en dichas zonas y expresaban EGFP expresaban también *RhoB* (no se muestra). De un modo similar, y como ya hemos descrito más arriba, aunque a las 20 horas después de la transfección el dominio dorsal de expresión de *RhoB* se extiende, sólo algunas células dispersas en otras regiones del tubo neural muestran una expresión ectópica de *RhoB*.

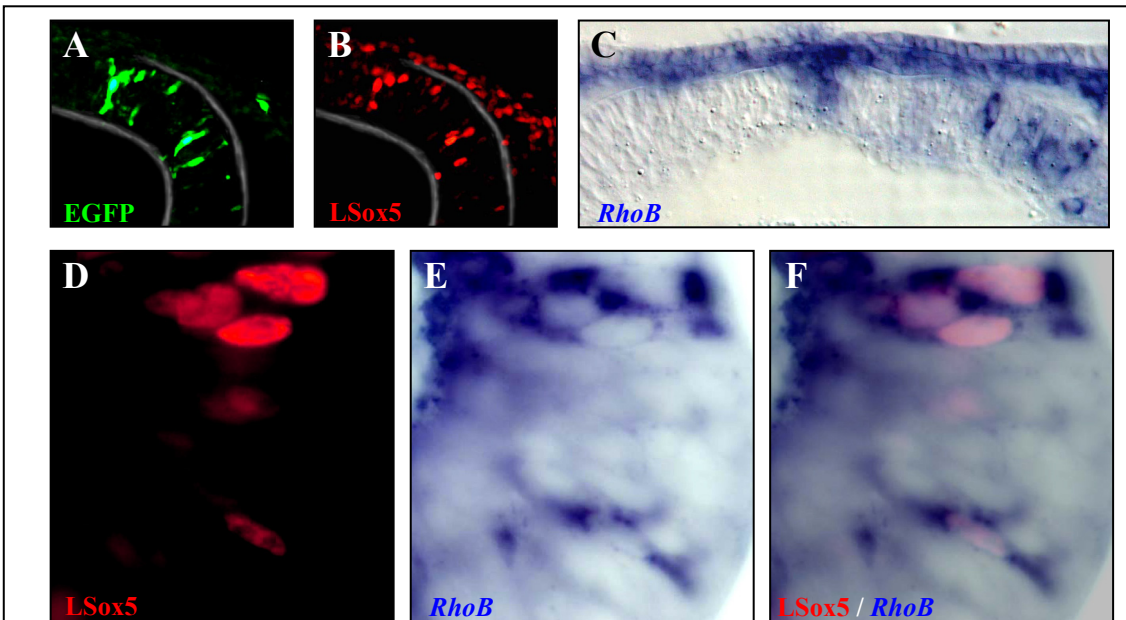


Fig. 36. La sobre-expresión de *LSox5* a las 6 horas de la electroporación induce la expresión ectópica de *RhoB* de un modo autónomo celular.

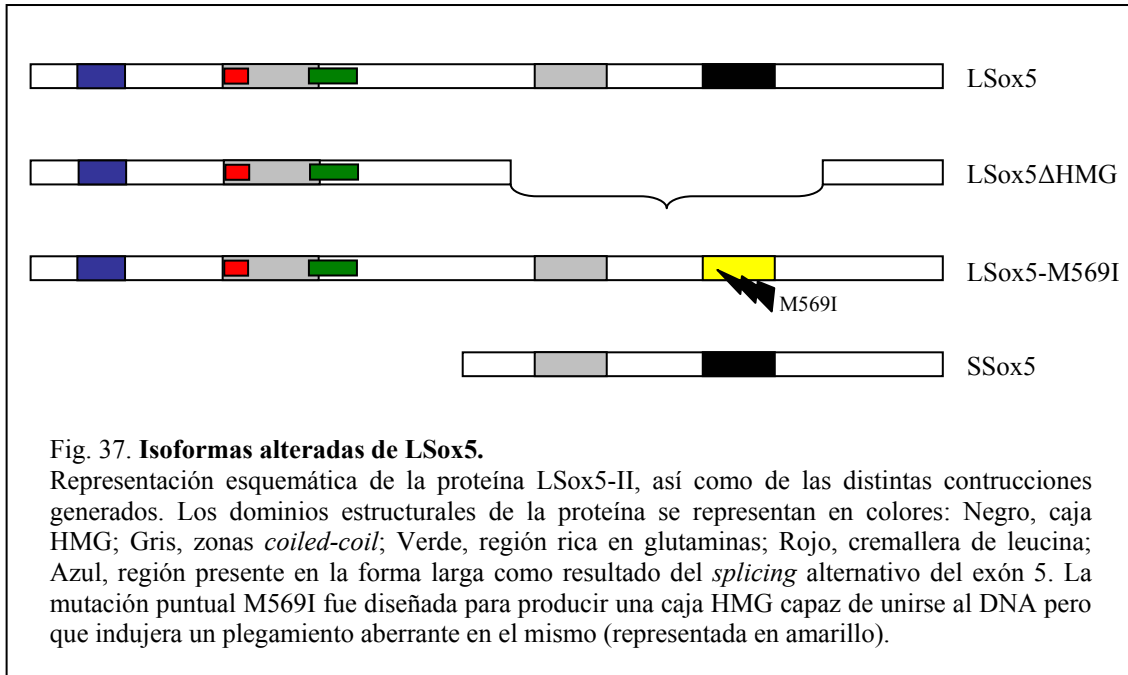
A las seis horas comienza a detectarse la expresión de EGFP (A) y *LSox5* (B) en el tubo neural, en un reducido grupo de células. Un número similar de células expresan *RhoB* en el lado electroporado de esos embriones (C). Una inmunohistoquímica contra *LSox5* (D) en cortes de agarosa de embriones a los que se había hecho una hibridación in situ contra *RhoB* (E), mostraron que el efecto era autónomo celular (F), es decir, que eran las mismas células las que tenían expresión ectópica de *LSox5* y *RhoB*.

En resumen, podemos decir que la expresión forzada de LSox5 es capaz de inducir rápidamente la expresión de *RhoB* en el tubo neural, y que este fenómeno es transitorio fuera del dominio dorsal del mismo.

5. 3. 6. Dominios funcionales de LSox5 implicados en la generación de cresta neural cefálica

Vistos los efectos producidos por la sobre-expresión de LSox5 sobre la cresta neural, intentamos analizar los efectos de su bloqueo. Para ello preparamos tres versiones alteradas del cDNA de LSox5 y las introdujimos en el vector pCX, para posteriormente ser ensayadas mediante electroporación (Fig. 37). La primera consiste en una delección de 795 pares de bases de *LSox5*, que elimina el segundo *coiled-coil* y la caja HMG de unión al DNA (LSox5ΔHMG). En la segunda, se introduce una mutación puntual en una región muy conservada de la caja HMG (LSox5-M569I), mutación análoga a otra descrita en el gen *SRY* humano y que produce una reversión sexual (Murphy *et al.*, 2001). La tercera corresponde a la forma corta de Sox5 (SSox5), que no se expresa en el embrión de pollo y que, en mamíferos, se expresa únicamente en los testículos del macho adulto (Hiraoka *et al.*, 1998).

LSox5ΔHMG no contiene el dominio de unión al DNA, y con esta construcción se intentaba el secuestro de cofactores necesarios para su función, por lo que en un fondo celular normal podría actuar como un antimorfo (dominante negativo). Cuando electroporamos esta forma truncada, no se observó ningún cambio en el patrón normal de expresión de los genes estudiados. Se ha descrito que las interacciones Sox9/Sox6/LSox5, que tienen lugar durante la condrogénesis, son cooperativas y precisan del sitio de unión correcto en el DNA. La existencia de interacciones similares con otros cofactores en la cresta neural podría explicar la ausencia de fenotipos con la sobre-expresión de esta forma truncada.



Con la construcción LSox5-M569I se hizo un segundo intento de bloqueo de la función normal de LSox5 en la generación de cresta neural. La mutación puntual fue diseñada intentando mimetizar los efectos que una mutación análoga produce en el factor de transcripción SRY humano. En este caso, la forma SRY mutante es capaz de unirse al DNA casi con la misma afinidad que la forma no mutada, pero el ángulo de torsión que provoca en el DNA es 13° menor de lo normal (Murphy *et al.*, 2001). El efecto esperado era, por tanto, que LSox5-M569I fuera capaz de unirse al DNA y bloqueara la unión del factor endógeno. Los resultados de la electroporación fueron los mismos que en el caso anterior, esto es, no se observó ningún fenotipo. Queda clara la relevancia del residuo de metionina en la posición 569 de LSox5-II para provocar los efectos antes descritos por sobre-expresión, aunque los mecanismos de la mutación no sean los mismos que operan en el factor SRY humano.

Con la tercera construcción, equivalente a la forma corta SSox5, se pretendía evitar la interacción de cofactores putativos con la primera región *coiled-coil* de la mitad amino de LSox5. En contra de lo esperado, cuando electroporamos esta construcción, nos sorprendió comprobar que SSox5 es capaz de inducir los mismos fenotipos en los embriones electroporados que

la isoforma larga LSox5-II, al menos en lo que se refiere al aumento en la expresión de *RhoB*, *FoxD3* y *Sox10*, (Fig. 38, A-C). Estos resultados parecen indicar que la información estructural contenida en SSox5 es suficiente para cumplir con las necesidades funcionales de este factor durante el desarrollo temprano de la cresta neural.

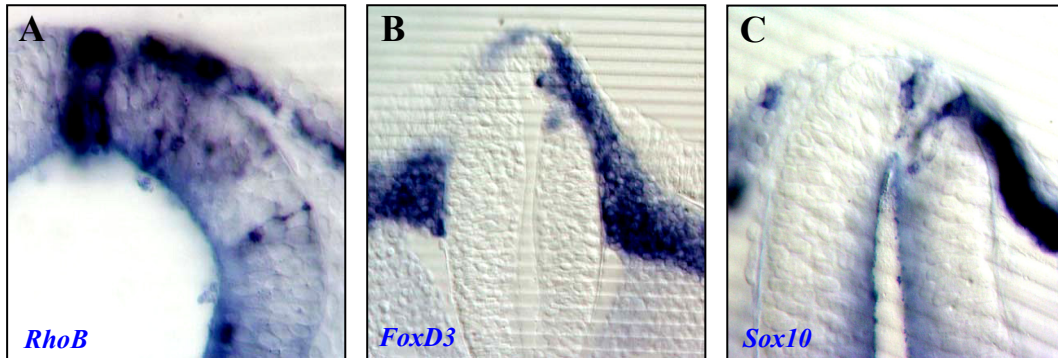


Fig. 38. La sobre-expresión de SSox5 es capaz de aumentar la generación de cresta neural.

La electroporación de la forma corta SSox5 induce la expresión ectópica de *RhoB* en el lado transfectado del tubo neural cefálico (A), así como la salida de una mayor cantidad de cresta neural marcada con *FoxD3* (B) y *Sox10* (C).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6. 1. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *Sox5* DE POLLO

Hemos clonado el ortólogo del gen *Sox5* en el pollo, del cual hemos aislado dos variantes de expresión (*LSox5-I* y *LSox5-II*) durante la embriogénesis temprana de este organismo. Los productos del gen *Sox5* pertenecen, junto con los de los genes *Sox6* y *Sox13*, al subgrupo D de la familia Sox de factores de transcripción (Schepers *et al.*, 2002). En mamíferos, se había descrito inicialmente la expresión de una isoforma corta de *Sox5* (*SSox5*) en los testículos del ratón adulto (Denny *et al.*, 1992), y posteriormente se identificaron las isoformas largas, tanto en el humano como en el ratón (Hiraoka *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 2002). *SSox5* contiene una caja HMG de unión al DNA, así como una región *coiled-coil*, mientras que las formas largas poseen además una región rica en glutaminas y una región *coiled-coil* adicional capaz de formar cremalleras de leucina.

La secuencia de aminoácidos de *LSox5* de pollo tiene un porcentaje de identidad superior al 90% con los ortólogos de mamífero, y en determinadas regiones de la proteína, tales como la caja HMG, el primer *coiled-coil* y la región rica en glutaminas, la identidad es total. Sin embargo, la proteína *LSox5* de pollo tiene características diferenciales. Contiene aproximadamente un 10% más de residuos de serina y treonina que sus ortólogos de mamífero. Esto da lugar a que, cuando se analizan las secuencias proteicas en busca de sitios de fosforilación (Blom *et al.*, 1999), se encuentren un 14% más de sitios putativos en la proteína de pollo que en las de mamíferos. La mayor parte de las sustituciones de aminoácidos que producen la aparición de serinas o treoninas adicionales se concentran entre las posiciones 426-456 de la secuencia del pollo. Esta región incluye además un motivo de 9 aminoácidos, que contiene 3 de los sitios

suplementarios de fosforilación potencial, y que no está presente en las proteínas LSox5 de mamíferos.

Esto sugiere que en el pollo existen mecanismos específicos que permiten regular la actividad de LSox5 mediante fosforilación. Lo cual no sería de extrañar, dado que la regulación de la actividad de otros factores de la familia Sox por medio de la fosforilación de serinas ya ha sido demostrada previamente. Este es, por ejemplo, el caso de Sox9, cuya actividad durante el proceso de formación de los cartílagos, en el cual coopera con LSox5 y Sox6 para activar el gen *Col2a1*, se ha visto que está controlada por la proteína quinasa A a través de una fosforilación dependiente de AMP cíclico (Huang *et al.*, 2000).

El análisis de la versión preliminar del genoma de pollo disponible en Internet (<http://www.ensembl.org/>), nos ha permitido localizar la mayor parte del gen *Sox5* dentro de una región de unas 250 kbp presente en el cromosoma 1. La estructura genómica es muy similar a la descrita para el gen humano (Ikeda *et al.*, 2002). Para la generación de las isoformas de *LSox5* se utilizan no menos de 15 exones, dos de los cuales pueden procesarse de manera diferencial durante el *splicing*. Así, la región de 105 nucleótidos que distingue las formas *LSox5-I* y *LSox5-II* se genera por el uso alternativo de dos sitios donadores del *splicing* presentes en el segundo exón. De modo similar, la secuencia que da lugar al motivo rico en serinas de 9 aminoácidos antes mencionado, proviene del uso de dos sitios aceptores de *splicing* que se encuentran en el exón XI del pollo. Esta diversidad parece específica del genoma del pollo, ya que la posibilidad de incorporar este dominio se ha perdido en los mamíferos analizados, mientras que, por el contrario, examinados los genomas conocidos de peces, la inclusión del mismo parece constitutiva en ellos.

6. 2. EXPRESIÓN DE *LSox5* DURANTE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN DE POLLO

Dado que el cDNA *LSox5* de pollo se aisló como consecuencia de un rastreo en busca de genes inducidos entre los estadios de desarrollo HH8 y HH11, no resulta extraño que la expresión de *LSox5* sea particularmente abundante en la cresta neural cefálica, ya que es precisamente en este momento en el que la cresta neural de la cabeza se genera y comienza a migrar. *LSox5* se expresa en la cresta premigratoria y migratoria de la región craneal, aunque también lo hace con menor intensidad en la cresta neural del tronco.

En estadios tempranos *LSox5* se expresa en todo el epitelio del prosencéfalo prospectivo, mientras que en regiones más caudales su expresión se restringe fundamentalmente a los bordes de los pliegues neurales, en el lugar de generación de la cresta neural. Este comportamiento es particular de *LSox5*, ya que otros genes que están implicados en el proceso de formación de cresta neural, como *Slug*, *Sox9* y *FoxD3*, restringen su expresión a las regiones de generación de cresta neural (en este contexto). En el caso de *FoxD3* aparecen datos contradictorios en la bibliografía, ya que se ha descrito una expresión transitoria en la región más rostral del neuroepitelio (Kos *et al.*, 2002), que nosotros no hemos encontrado en ningún caso.

En la cabeza, la aparición de la expresión de *LSox5* sigue el bien establecido gradiente de desarrollo anterioposterior, como los demás factores implicados en la generación de la cresta neural. No obstante, hemos visto que *Sox9*, *Slug* y *FoxD3* preceden todos a *LSox5*, mientras que éste coincide temporalmente con la aparición de *RhoB*, y precede a *Sox10*.

Es de particular interés hacer notar que tanto *LSox5* como *Slug* y *RhoB* se expresan de forma continua en el primordio del cerebro posterior, aunque los niveles sean menores a la altura de los rombómeros 3 y 5. Otros genes como *Sox9*, *FoxD3* y *Sox10* no se expresan en el rombómero 3 (Liu y Jessell, 1998, Cheng *et al.*, 2000; Kos *et al.*, 2002 y nuestros propios

datos). Aunque desconocemos el significado funcional de este hecho por el momento, la ausencia de estos factores podría estar relacionada con el hecho de que en este rombómero se produce mucha menos cresta y además una buena parte de ella desaparece por apoptosis (Graham *et al.*, 1993).

Por lo tanto, y basándonos en sus patrones de expresión relativos, situaríamos a *LSox5* inmediatamente después de otros factores como *Slug*, *Sox9* y *FoxD3*, por delante de *Sox10*, y a un nivel semejante a *RhoB*.

Una vez migran las células de la cresta neural cefálica, la expresión de *LSox5* persiste en los derivados gliales de la misma. De este modo, se puede ver que una buena parte de las células que expresan *LSox5* se sitúan acompañando a los distintos nervios que recorren la cabeza, y que estas células coexpresan P_0 , un marcador temprano de las células de Schwann (Bhattacharyya *et al.*, 1991). *LSox5* es por tanto uno de los primeros genes que se expresan en las células de Schwann, tal y como se pudo observar en las células que se posicionan a la salida de los principales nervios craneales, en las cuales la expresión de *LSox5* es muy anterior a la de P_0 . *LSox5* también se expresa abundantemente en las células de glía satélite, de pequeño tamaño y núcleo en forma de huso, que se sitúan entre las neuronas de los distintos ganglios craneales.

Las neuronas sensoriales de algunos ganglios craneales y las neuronas de los ganglios parasimpáticos, como el ciliar, provienen de la cresta neural cefálica. Hemos comprobado que en estos ganglios la expresión de *LSox5* desaparece del linaje neuronal durante su diferenciación, aunque según los casos, el final de la expresión de *LSox5* tiene lugar en etapas diferentes. Así, en el ganglio trigémino, la diferenciación de las neuronas provenientes de la cresta neural ocurre entre los días de desarrollo E4 y E7 en la región proximal del ganglio (D'Amico-Martel y Noden, 1980; Narayanan y Narayanan, 1980; Ayer-Le Lièvre y Le Douarin, 1982). Es en esta zona y en estas etapas del desarrollo donde pudimos observar la desaparición progresiva de *LSox5* que, en una franja de células, llegaba a coexpresarse con los factores de diferenciación *Islet* y

Brn3a. Por el contrario, en el ganglio ciliar, nunca detectamos células con doble marcaje LSox5 y Islet, por lo que la desaparición de LSox5 de esta población debe producirse antes de la condensación del ganglio. Los neuroblastos del ganglio geniculado, aunque son de origen placodal, representarían un caso intermedio en el que LSox5 se coexpresa con Islet, pero no con Brn3a, que corresponde a una etapa posterior de diferenciación (Fedtsova *et al.*, 2003).

Algunos estudios han propuesto que en el ganglio trigémino sólo las neuronas que provienen de las placodas expresan Brn3a, mientras que los neuroblastos provenientes de la cresta neural no expresan dicho factor (Artinger *et al.*, 1998). Estos resultados se basan en el marcaje de precursores con DiI y su seguimiento y posterior hibridación *in situ* para *Brn3a* en estadio HH16. En estadios posteriores únicamente analizan por inmunohistoquímica la posición que ocupan las células que expresan Brn3a. Como hemos visto, en el estadio HH16 los neuroblastos provenientes de la cresta neural todavía no han comenzado a diferenciarse. Más adelante, la coexpresión de Brn3a y LSox5 se restringe a una zona límite entre ambas poblaciones neuronales, pero los gradientes inversos de LSox5 y Islet/Brn3a sugieren que en esta franja las células que se diferencian son de cresta neural. De hecho, trabajos más recientes relacionan la aparición de Islet y Brn3a con sucesivos estados de maduración de las neuronas sensoriales, más que con su origen embrionario (Fedtsova *et al.*, 2003).

Por último, hemos visto que LSox5 se expresa también en otras regiones del sistema nervioso, tales como la placa del suelo del tubo neural, el prosencéfalo y el diencéfalo ventral, la retina, la salida del nervio óptico o las placodas óticas, pero la función que pueda estar desempeñando en dichas estructuras no ha sido analizada en el presente trabajo, y posiblemente muchas de ellas sean funciones diferentes a las que realiza en el desarrollo de la cresta neural.

6. 3. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE *LSox5* INDUCE DE FORMA INMEDIATA LA EXPRESIÓN DE *RhoB*

La inducción de la expresión de *RhoB* ocurre de un modo inmediatamente consecuente a la expresión ectópica de *LSox5* en todo el epitelio del tubo neural. Este fenómeno es autónomo celular y presenta inicialmente una penetrancia casi completa, es decir, que la mayor parte de las células que comienzan a expresar *LSox5* ectópico muestran la inducción de *RhoB*, independientemente de su localización en el tubo neural. A medida que transcurre el tiempo después de la electroporación y que, por tanto, la expresión de *LSox5* se generaliza y se hace más intensa en todo el tubo neural, el número de células que expresan *RhoB* aumenta dramáticamente en la región dorsal del tubo, al tiempo que se produce una delaminación masiva de células que expresan diferentes marcadores característicos de la cresta neural. Por el contrario, el número de células que expresan *RhoB* en regiones mediales y ventrales del tubo neural se mantiene más o menos constante, lo que sugiere que dicho entorno es refractario a esta inducción.

Se ha propuesto que *RhoB* está involucrado en los cambios de adhesión y morfología celular que tienen lugar justo antes y durante la delaminación de la cresta neural, regulando la polimerización de los filamentos de actina, y la formación de adhesiones focales (Liu y Jessell, 1998). En este contexto, es necesario hacer notar que muchas de las células que son inducidas a expresar *RhoB* fuera del dominio de competencia para la formación de cresta neural permanecen atrapadas dentro del tubo neural, y mantienen un aspecto epitelial. Sólo algunas de las células transfectadas con *LSox5*, que presumiblemente se encontraban cerca de la lámina basal del tubo neural en el momento de la electroporación, son capaces de delaminar e invadir el mesénquima adyacente. No obstante, en este último caso no expresan ningún otro gen característico de la cresta neural.

Estos resultados, unidos al hecho de que el patrón de expresión de *LSox5* y *RhoB* es muy similar en la cresta premigratoria del embrión de

pollo, apuntan como muy probable el hecho de que LSox5 induzca directamente *RhoB*. En consecuencia, las células transfectadas adquieren la competencia para producir cambios en su morfología, romper la lámina basal y salir del tubo neural. Sin embargo, es necesario que dichas células se encuentren en un dominio competente para que se produzca una transición epitelio-mesénquima completa y adquieran el fenotipo de cresta neural.

Otro aspecto llamativo de la inducción de *RhoB*, y en general de los fenotipos observados tras la electroporación, es que efectos similares se puedan obtener mediante la electroporación de la forma corta SSox5, cuya expresión se encuentra normalmente restringida a tejidos adultos. La introducción de una mutación puntual en la caja HMG de LSox5 hace que éste se comporte como un nulo, ya que suprime los efectos de la sobre-expresión, pero no parece bloquear la actividad del producto normal endógeno. Estudios llevados a cabo con el modelo de condrogénesis *in vitro* sugieren que LSox5 no contiene un dominio de transactivación (Lefebvre *et al.*, 1998), y que necesita la interacción con otros factores para inducir la transcripción de otros genes. La distribución diferencial de cofactores en distintas regiones del tubo neural podrían dar cuenta, por tanto, de las diferencias observadas tras la sobre-expresión de LSox5. Sin embargo, otros estudios *in vitro* muestran que Sox6 es capaz de transactivar a genes testigo a pesar de la delección completa de la región que contiene el primer dominio *coiled-coil*; mientras que, por el contrario, las formas nativas solas fallan en el ensayo de transactivación, porque forman homodímeros que resultan incapaces de unirse al DNA (Takamatsu *et al.*, 1995). Nuestros propios resultados (no mostrados aquí) han puesto de manifiesto la alta capacidad de activación de la forma SSox5 en el sistema de dobles híbridos de levadura. Sería interesante, por tanto, hacer un estudio más exhaustivo en busca de una posible región de transactivación en la proteína SSox5. En cualquier caso, la formación de homodímeros o heterodímeros activos con otros factores de transcripción a través del único dominio *coiled-coil* presente en la isoforma SSox5 es factible y puede ser considerada como origen de los efectos observados.

6. 4. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LSox5 AUMENTA LA GENERACIÓN DE CRESTA NEURAL CEFÁLICA

Hemos mostrado que la sobre-expresión de LSox5 en el neuroepitelio cefálico produce un incremento dramático de la delaminación de células en la región dorsal, y que estas células expresan diversos genes característicos de la cresta neural cefálica, tales como *Slug*, *RhoB*, *FoxD3*, *Sox10* y *Pax7*, así como el epítipo HNK1. Mientras que la inducción de *RhoB* es apreciable a las pocas horas después de la transfección, los demás genes sólo se inducen tras períodos de tiempo más prolongados, lo que sugiere que su inducción es probablemente indirecta.

Además, la sobre-expresión de LSox5 aumenta la competencia temporal de producción de cresta neural, de forma que en el lado electroporado continúa la generación de cresta bastante tiempo después de que, como fisiológicamente ocurre, haya concluido en el lado contralateral control. Sucede también que el epítipo HNK1, que en condiciones normales comienza a expresarse después de que las células de la cresta hayan migrado una cierta distancia (del Barrio y Nieto, 2004), adelanta su expresión en algunas células del lado electroporado. Incluso algunas células en el tubo neural y con aspecto epitelial expresan este marcador de forma aberrante. Aunque no hemos comprobado si esta expresión aberrante de HNK1 coincide o sigue a la inducción ectópica de *RhoB* en las mismas células, podríamos pensar que este fenómeno esté reproduciendo de alguna manera una vía fisiológica del desarrollo normal de la cresta neural, en la que la expresión de *LSox5* y *RhoB* preceden a la de HNK1. En nuestro caso podríamos estar acelerando este proceso en algunas células al aumentar de manera artificial los niveles de LSox5. En condiciones normales, la expresión de LSox5 aumenta progresivamente según las células de cresta neural comienzan a migrar y algunos linajes se van diferenciando, de modo que su sobre-expresión a niveles muy altos podría inducir la transición a estados de diferenciación más avanzados de lo normal. Muchos de estos efectos se han observado también como consecuencia de la sobre-expresión de otros genes implicados en la formación de cresta neural, tales como la *Noelin-1* (Barenbaum *et al.*, 2000), *FoxD3* (Kos *et al.*, 2001; Dottori *et al.*,

2001), *Slug* (del Barrio y Nieto, 2002), *Sox10* (Aoki *et al.*, 2003), y *Sox9* (Cheung y Briscoe, 2003).

La sobre-expresión de *LSox5* también expande el dominio de la región dorsal del tubo neural con competencia para generar cresta neural. Esta extensión corre pareja con el aumento de la región en la que la membrana basal se rompe para permitir la salida, masiva en algunos casos, de las células de cresta neural generadas. Sin embargo, una vez fuera, la migración de dichas células tiene lugar a lo largo de las vías típicamente definidas para ello. Este mismo efecto se produce también en el caso de la sobre-expresión de *Slug* (del Barrio y Nieto, 2002).

La electroporación de *LSox5* produce asimismo una disminución de la expresión de la *N-cadherina* en la región dorsal del lado del tubo neural transfectado. Se ha visto que la pérdida de la *N-cadherina* es un paso previo a la salida de las células de cresta del tubo neural, y que su sobre-expresión produce una menor delaminación de cresta (Nakagawa y Takeichi, 1995; Nakagawa y Takeichi, 1998). Por lo tanto, la desaparición de la *N-cadherina* como consecuencia de la sobre-expresión de *LSox5* es un fenómeno coherente con la extensión del dominio dorsal de expresión de *Slug* y *RhoB*, y con la inducción de una mayor delaminación de células.

Diversos estudios han mostrado que señales instructivas procedentes del ectodermo no neural y del mesodermo paraxial, a través de miembros de las familias de las BMPs, los Wnts y los FGFs, son inductores de fenotipos dorsales en general y de la cresta neural en particular (Liem *et al.*, 1995; Ikeya *et al.*, 1997; LaBonne y Bronner-Fraser, 1998). Se ha descrito también que la sobreproducción experimental de cresta neural generada por el aumento de expresión de factores como *Sox9* o *FoxD3* tiene lugar a expensas de otros tipos celulares del sistema nervioso central, y que no está mediada por estos factores solubles (Dottori *et al.*, 2001; Cheung y Briscoe, 2003). Este mismo esquema parece ser aplicable a la expresión ectópica de *LSox5*, ya que nuestros datos muestran que no hay aumento de la expresión de *BMP4*, *BMP7* o *Wnt-1*. Si acaso, se puede detectar en algunos casos un descenso de la expresión de *BMP7* y *Wnt-1*, aunque este

efecto es debido fundamentalmente a la delaminación masiva que se produce, que hace que en la región dorsal del lado transfectado el número de células se reduzca dramáticamente.

Como hemos mencionado con anterioridad, la sobreproducción de cresta neural es un efecto reproducible mediante la sobre-expresión de distintos factores de transcripción pertenecientes a la cascada fisiológica de señalización. En nuestros experimentos, la sobre-expresión de LSox5 provoca la sobreproducción de cresta al tiempo que el aumento de los niveles de expresión de Slug y FoxD3, factores que, aceptando los datos referentes al inicio de expresión de cada uno, se encuentran por encima en la cascada de señalización aludida. Esta aparente contradicción fuerza a sugerir la existencia de mecanismos de retroalimentación que podrían actuar *in vivo*. En apoyo de esta posibilidad existen datos procedentes de estudios de inducción de la transición epitelio-mesénquima *in vitro*. En ellos se muestra una modulación de la propia TEM por el balance de numerosos factores de adhesión entre células, de éstas con la matriz extracelular, e incluso de moléculas del citoesqueleto (Newgreen y Minichiello, 1995; Somasiri *et al.*, 2001). En un sistema *in vitro* de células neuroepiteliales de codorniz, la inhibición farmacológica de la proteína quinasa C provoca cambios en el citoesqueleto y una transformación de la apariencia de las células hacia morfologías más mesenquimáticas (Minichiello *et al.*, 1999). Se ha comprobado que en esta transición se produce también inducción de la expresión de Slug y Sox10 (Newgreen, comunicación personal). Es por tanto imaginable que un aumento primario de RhoB (y muy posiblemente de otros efectores citoplásmicos, de membrana o extracelulares), como consecuencia directa de la sobre-expresión de LSox5, provoque una TEM en la región dorsal del tubo neural, a la vez que dispare la expresión de eslabones de la cadena de señalización anteriores como Slug o FoxD3.

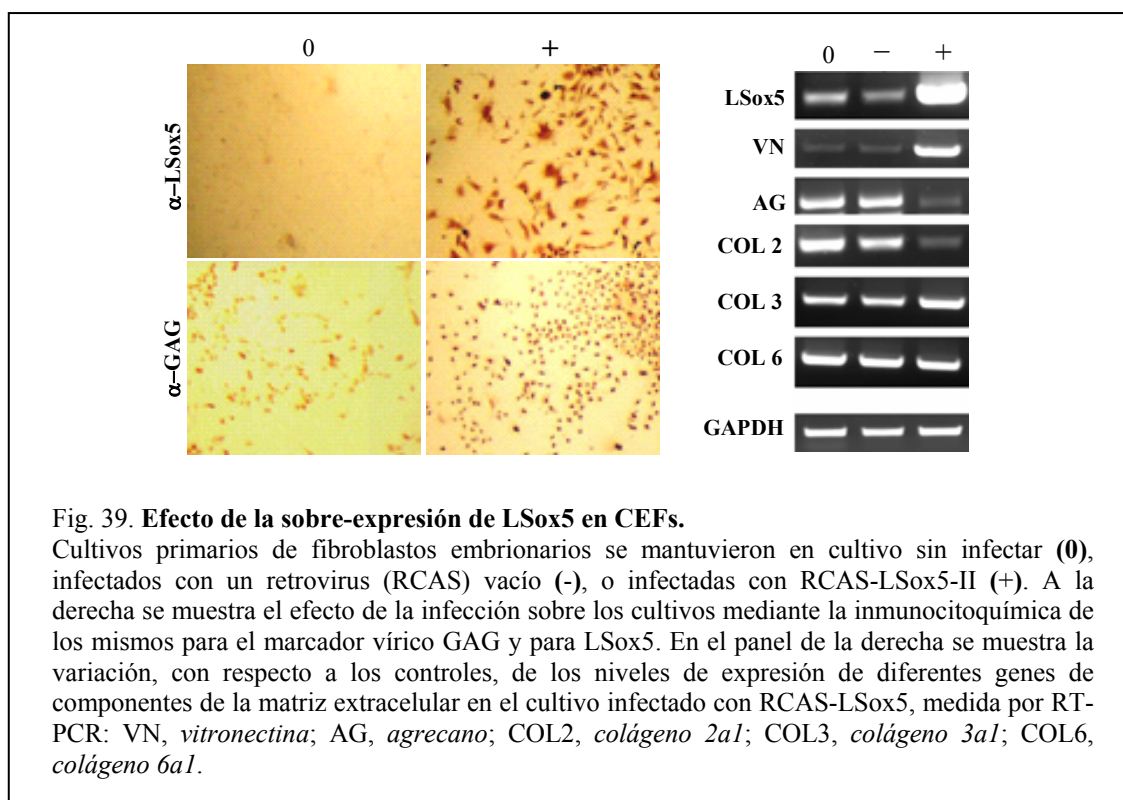
Un corolario de la existencia de mecanismos de retroalimentación como los mencionados en el párrafo anterior, es la posibilidad añadida de que, al incluir entre éstos moléculas de señalización de membrana y extracelulares, la respuesta deje de ser autónoma celular. Esta posibilidad parece apoyada por nuestros propios datos experimentales, ya que en todos

los casos de salida masiva de cresta tras la sobre-expresión de LSox5, se podía observar que muchas de estas células parecían no haber sido transfectadas, o al menos no expresaban el marcador EGFP.

En este mismo sentido, hemos realizado una serie de ensayos con células en cultivo que, por lo preliminar de los mismos no se incluyen en la sección de resultados, pero que merece la pena mencionar en este contexto de la discusión. Está bien descrito el papel que distintos componentes de la matriz extracelular pueden ejercer durante la migración de la cresta neural, y como consecuencia se ha establecido una clasificación que atiende al comportamiento que las células de la cresta neural adoptan sobre los distintos substratos de migración (revisado en Perris y Perissinotto, 2000). Así, hay componentes permisivos, que permiten e incluso facilitan la migración de la cresta neural, entre los que se encuentran la vitronectina, y el colágeno de los tipos III y VI, entre otros. Componentes no permisivos son los que dificultan el proceso de migración, como el colágeno de tipo II. Por último, el agrecano es por el momento el único factor de matriz extracelular que se ha demostrado que tiene un efecto inhibitorio sobre la migración de la cresta neural, y se expresa abundantemente en la notocorda (Perris *et al.*, 1996). Nosotros hemos infectado cultivos primarios de fibroblastos embrionarios con retrovirus que expresan LSox5 y analizado la expresión de distintos componentes de la matriz extracelular (Fig. 39). Curiosamente, la sobre-expresión de LSox5 redujo significativamente la expresión tanto del agrecano como del colágeno de tipo II, mientras que la vitronectina aumento drásticamente, el colágeno de tipo III lo hizo de forma moderada, y el colágeno de tipo 6 no varió su expresión. Estos resultados, obtenidos con un tipo celular semejante a las células de la cresta neural migratoria como son los fibroblastos, se adecúan bastante bien con las preferencias fisiológicas de la cresta neural en migración.

Conviene destacar al mismo tiempo, que en un sistema completamente distinto, como es el proceso de condrogénesis, se ha demostrado que la actuación cooperativa de LSox5, Sox6 y Sox9 activa la expresión del colágeno de tipo II y del agrecano (Lefebvre *et al.*, 1998);

acentuando la enorme importancia del entorno de actuación de este factor de transcripción.



El entorno, también puede condicionar la propia interacción entre factores de la familia Sox. La sobre-expresión de Sox9 en el tubo neural activa la vía de producción de cresta, en la que más tarde aparecerá inducido Sox10 (Cheung y Briscoe, 2003). Como hemos visto que ocurre con LSox5, la expresión de Sox10 se mantiene posteriormente en el linaje glial (Britsch *et al.*, 2001), donde se ha visto que regula la expresión de P₀ (Peirano *et al.*, 2000). Podemos pensar, por tanto, en la posibilidad de que durante el desarrollo de la cresta neural se produzcan interacciones entre factores Sox de los grupos D y E, similares a las existentes durante la condrogénesis. Así, Sox9 podría inducir la expresión de LSox5, el cual podría luego interaccionar con Sox10 (otro miembro del grupo E) durante la diferenciación glial. Dado que el comienzo de la expresión de Sox10 en la cresta neural parece ser ligeramente posterior a la de LSox5, sería también posible que la expresión de Sox10 estuviera controlada por LSox5, tal y como sugieren nuestros experimentos de sobre-expresión de LSox5. Alternativamente, la expresión de forzada Sox10 después de la sobre-

expresión de LSox5 podría ser la causa de la sobreproducción de cresta neural al suplantarse la función de Sox9. La solución de todas estas posibilidades requerirá un estudio mucho más detallado de las interacciones entre los distintos actores que toman parte en la generación de la cresta neural.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Hemos clonado el factor de transcripción *LSox5* del pollo, el cual, aunque en líneas generales presenta una estructura y una diversidad similares a las de sus ortólogos en otras especies, posee además un motivo estructural, que no está presente en los mamíferos, y que le confiere una potencialidad de regulación específica.

El factor *LSox5* se expresa mayoritariamente en la cresta neural cefálica premigratoria y migratoria del embrión de pollo, y el inicio de su expresión en la región dorsal del tubo neural presenta un cierto retraso en comparación con la de los factores *Slug*, *Sox9* y *FoxD3*, los tres relacionados con la generación de la cresta neural. Subsecuentemente, la expresión de *LSox5* se mantiene en algunos derivados de la cresta neural, y podría ser requerido para el desarrollo del linaje glial, incluyendo las células de Schwann y la glía satélite de los ganglios craneales.

En ensayos de sobre-expresión, *LSox5* produce la inducción inmediata de *RhoB* en cualquier punto del eje dorso-ventral del neuroepitelio. Más tarde, la sobre-expresión prolongada de *LSox5* extiende el dominio de competencia dorsal a partir del cual se diferencia cresta neural, así como el periodo temporal de generación de la misma. En consecuencia, da lugar a una sobreproducción de cresta neural cefálica. Estos datos localizan el papel funcional de *LSox5* por debajo de los factores de transcripción considerados generadores de cresta neural, e inmediatamente por encima de los efectores implicados en la transición epitelio-mesénquima.

El hecho de que la expresión de factores instructivos solubles como BMP4, BMP7 y Wnt-1 permanezca inalterada tras la expresión forzada de *LSox5*, mientras que la expresión factores de transcripción como *Slug*, *Sox9* y *FoxD3* aumenta, sugiere la existencia de mecanismos de

retroalimentación en el desarrollo de la cresta neural que no llegan hasta los primeros, pero sí hasta los segundos.

Nuestros datos sugieren que durante el desarrollo de la cresta neural cefálica se pueden producir interacciones entre miembros del grupo E de la familia Sox (Sox9 y Sox10) y uno del grupo D (LSox5), de un modo similar al que tiene lugar durante la formación del cartílago.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

Adams, R. H., Diella, F., Hennig, S., Helmbacher, F., Deutsch, U. y Klein, R. (2001). The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell* **104**, 57-69.

Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. y de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813-28.

Anderson, C. B. y Meier, S. (1981). The influence of the metameric pattern in the mesoderm on migration of cranial neural crest cells in the chick embryo. *Dev. Biol.* **85**, 385-402.

Aoki, Y., Saint-Germain, N., Gyda, M., Magner-Fink, E., Lee, Y. H., Credidio, C. y Saint-Jeannet, J. P. (2003). Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **259**, 19-33.

Artinger, K. B., Fedtsova, N., Rhee, J. M., Bronner-Fraser, M. y Turner, E. (1998). Placodal origin of Brn-3-expressing cranial sensory neurons. *J. Neurobiol.* **36**, 572-585.

Assumpcao, J. G., Benedetti, C. E., Maciel-Guerra, A. T., Guerra, G. Jr., Baptista, M. T., Scolfaro, M. R. y de Mello, M. P. (2002). Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. *J. Mol. Med.* **80**(12), 782-790.

Ayer-Le Lievre, C. S. y Le Douarin, N. M. (1982). The early development of cranial sensory ganglia and the potentialities of their component cells studied in quail-chick chimeras.. *Dev. Biol.* **94**(2), 291-310.

Baker, C. V. H. y Bronner-Fraser, M. (1997). The origins of the neural crest. Part II: An evolutionary perspective. *Mech. Dev.* **69**, 13-29.

Barembaum, M., Moreno, T. A., LaBonne, C., Sechrist, J. y Bronner-Fraser, M. (2000). Noelin-1 is a secreted glycoprotein involved in generation of the neural crest. *Nat. Cell Biol.* **2**, 219-25.

Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J. y Garcia de Herreros, A. (2000). The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 84-89.

Barlow, L. A. (2002). Cranial nerve development: placodal neurons ride the crest. *Curr. Biol.* **12**(5), R171-173.

Berger, B., Wilson, D. B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M., y Kim, P. S. (1995). Predicting Coiled Coils by Use of Pairwise Residue Correlations. *P. N. A. S. USA.* **92**, 8259-8263.

Bergstrom, D., Young, M., Albrecht K. y Eicher, E. (2000). Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genesis* **28**, 111-124.

Berndt, J. D., Isadore, A. y Halloran, M. C. (2002). A role for semaphorin 3D, a secreted cell-signaling molecule, in zebrafish cranial neural crest cell delamination and migration. *Dev. Biol.* **247**, 497-497.

Bhattacharyya, A., Frank, E., Ratner, N. y Brackenbury, R. (1991). P0 is an early marker of the Schwann cell lineage in chickens. *Neuron* **7**, 831-844.

Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. y de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* **22**, 85–89.

Birgbauer, E., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M. y Fraser, S. (1995). Rhombomeric origin and rostrocaudal reassortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development* **121**, 935-945.

Blom, N., Gammeltoft, S. y Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351-1362.

Bondurand, N., Kobetz, A., Pingault, V., Lemort, N., Encha-Razavi, F., Couly, G., Goerich, D. E., Wegner, M., Abitbol, M. y Goossens, M. (1998). Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett.* **432**(3), 168-172.

Bornberg-Bauer, E., Rivals, E. y Vingron, M. (1998). Computational Approaches to Identify Leucine Zippers. *Nucleic Acids Res.* **26**(11), 2740-2746.

Bouwmeester, T., Kim, S., Sasai, Y., Lu, B. y de Robertis, E. M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* **382**(6592), 595-601.

Bowles, J., Schepers, G. y Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* **227**, 239-255.

Boyer, B., Valles, A. M. y Edme, N. (2000). Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem. Pharmacol.* **60**(8), 1091-1099.

Britsch, S. E., Goerich, D., Riethmacher, D., Peirano, R. I., Rossner, M., Nave, K. A., Birchmeier, C. y Wegner, M. (2001). The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* **15**, 66-78.

Cano, A., Pérez, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., Del Barrio, M. G., Portillo, F. y Nieto, M. A. (2000). The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* **2**, 76-83.

Carver, E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K. F. y Gridley, T. (2001). The mouse Snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8184-8188.

Cheng, Y. C., Cheung, M., Abu-Elmagd, M. M., Orme, A. y Scotting, P. J. (2000). Chick Sox10, a transcription factor expressed in both early neural crest cells and central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **121**, 233-241.

Cheung, M. y Briscoe, J. (2003). Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development* **130**, 5681-5693.

Collignon, J., Sockanathan, S., Hacker, A., Cohen-Tannoudji, M., Norris, D., Rastan, S., Stevanovic, M., Goodfellow, P. N. y Lovell-Badge, R. (1996). A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* **122**(2), 509-520.

Corbel, C., Lehmann, A. y Davison, F. (2000). Expression of CD44 during early development of the chick embryo. *Mech. Dev.* **96**(1), 111-114.

Covell, D. A. y Noden, D. M. (1989). Embryonic development of the chick primary trigeminal sensory-motor complex. *J. Comp. Neurol.* **286**, 488-503.

d'Amico-Martel, A. y Noden, D. M. (1980). An autoradiographic analysis of the development of the chick trigeminal ganglion. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **55**, 167-182.

de Crombrughe, B., Lefebvre, V. y Nakashima, K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. (2001). *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**(6), 721-727.

del Barrio, M. G. y Nieto, M. A. (2002). Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* **129**, 1583-1593.

del Barrio, M. G. y Nieto, M. A. (2004). Relative expression of Slug, RhoB, and HNK-1 in the cranial neural crest of the early chicken embryo. *Dev. Dyn.* **229**, 136-139.

Denny, P., Swift, S., Connor, F. y Ashworth, A. (1992). An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA binding protein. *EMBO. J.* **11**, 3705-3712.

Dottori, M., Gross, M. K., Labosky, P. y Goulding, M. (2001). The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development* **128**, 4127-4138.

Duong, T. D. y Erickson, C. A. (2004). MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo. *Dev. Dyn.* **229**(1), 42-53.

Dutton, K. A., Pauliny, A., Lopes, S. S., Elworthy, S., Carney, T. J., Rauch, J., Geisler, R., Haffter, P. y Kelsh, R. N. (2001). Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development* **128**(21), 4113-25.

Eickholt, B. J., Mackenzie, S. L., Graham, A., Walsh, F. S. y Doherty, P. (1999). Evidence for collapsin-1 functioning in the control of neural crest migration in both trunk and hindbrain regions. *Curr. Biol.* **9**, R201–R204.

Erickson, C. A., Duong, T. D. y Tosney, K. W. (1992). Descriptive and experimental analysis of the dispersion of neural crest cells along the dorsolateral path and their entry into ectoderm in the chick embryo. *Dev. Biol.* **151**, 251–272.

Erickson, C. A. (1987). Behavior of neural crest cells on embryonic basal laminae. *Dev. Biol.* **120**(1), 38–49.

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. y Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell.* **87**(4), 661–673.

Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T. M. y Yamada, T. (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* **256**, 1555–1560.

Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C. J., Hofmann, K. y Bairoch, A. (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* **30**, 235–238.

Faure, S., Santa Barbara, P., Roberts, D. J. y Whitman, M. (2002). Endogenous patterns of BMP signaling during early chick development. *Dev. Biol.* **244**, 44–65.

Fedtsova, N., Perris, R. y Turner, E. E. (2003). Sonic hedgehog regulates the position of the trigeminal ganglia. *Dev. Biol.* **261**, 456–469.

Foerst-Potts, L. y Sadler, T. W. (1997). Disruption of *Msx-1* and *Msx-2* reveals roles for these genes in craniofacial, eye, and axial development. *Dev Dyn.* **209**(1), 70–84.

Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P. A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I. D., Goodfellow, P. N., Brook, J. D. y Schafer, A. J. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**, 525-530.

Gammill, L. S. y Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**(10), 795-805.

García-Castro, M. I., Marcelle, C. y Bronner-Fraser, M. (2002). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* **297**, 848-851.

Gasca, S., Canizares, J., de Santa Barbara, P., Mejean, C., Poulat, F., Berta, P. y Boizet-Bonhoure, B. (2002) A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11199-11204.

Ghislain, J., Desmarquet-Trin-Dinh, C., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, P. y Frain, M. (2003). Neural crest patterning: autoregulatory and crest-specific elements co-operate for Krox20 transcriptional control. *Development* **130**(5), 941-953.

Graham, A., Heyman, I. y Lumsden, A. (1993). Even-numbered rhombomeres control the apoptotic elimination of neural crest cells from odd-numbered rhombomeres in the chick hindbrain. *Development* **119**, 233-245.

Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. y Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sexdetermining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**, 245-250.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.

Halloran, M. C. y Berndt, J. D. (2003) Current progress in neural crest cell motility and migration and future prospects for the zebrafish model system. *Dev. Dyn.* **228**(3), 497-513.

Halloran, M. C., Severance, S. M., Yee, C. S., Gemza, D. L., Raper, J. A. y Kuwada, J. Y. (1999). Analysis of a Zebrafish semaphorin reveals potential functions in vivo. *Dev. Dyn.* **214**, 13-25.

Hamburger, V. y Hamilton, H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**, 49-92.

Hamburger, V. (1961). Experimental analysis of the dual origin of the trigeminal ganglion in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* **148**, 91-117.

Herbarth, B., Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Hermans-Borgmeyer, I., Puliti, A., Lemort, N., Goossens, M. y Wegner, M. (1998). Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**(9), 5161-5165.

Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Kido, S. y Aiso, S. (1998). The mouse Sox5 gene encodes a protein containing the leucine zipper and the Q box. *Biochim. Biophys. Acta* **1399**, 40-46.

Holland, L. Z. y Holland, N. D. (2001). Evolution of neural crest and placodes: amphioxus as a model for the ancestral vertebrate?. *J. Anat.* **199**, 85-98.

Huang, W., Zhou, X., Lefebvre, V. y de Crombrughe, B. (2000). Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4149-4158.

Hughes, S. y Kosik, E. (1984). Mutagenesis of the region between env and src of the SR-A strain of Rous sarcoma virus for the purpose of constructing helper-independent vectors. *Virology*. **136**(1), 89-99.

Hughes, S. H., Greenhouse, J. J, Petropoulos, C. J. y Sutrave, P. (1987) .Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *J Virol.* **61**(10), 3004-3012.

Ikeda, T., Zhang, J., Chano, T., Mabuchi, A., Fukuda, A., Kawaguchi, H., Nakamura, K. y Ikegawa, S. (2002). Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-SOX5) gene. *Gene* **298**, 59-68.

Ikeya, M., Lee, S. M., Johnson, J. E., McMahon, A. P. y Takada, S. (1997). Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* **389**, 966-970.

Itasaki, N., Bel-Vialar, S. y Krumlauf, R. (1999). 'Shocking' developments in chick embryology: electroporation and in ovo gene expression. *Nat. Cell Biol.* **1**, 203-207.

Johnston, M. C. (1966). A radioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo. *Anat. Rec.* **156**(2), 143-155.

Kamachi, Y., Uchikawa, M. y Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* **16**(4), 182-187.

Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R. y Kondoh, H. (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* **125**(13), 2521-2532.

Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R. y Kondoh, H. (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev.* **15**, 1272-1286.

Kawakami, A., Kimura-Kawakami, M., Nomura, T. y Fujisawa, H. (1997). Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. *Mech. Dev.* **66**(1-2), 119-130.

Kawasaki, T., Bekku, Y., Suto, F., Kitsukawa, T., Taniguchi, M., Nagatsu, I., Nagatsu, T., Itoh, K., Yagi, T. y Fujisawa, H. (2002). Requirement of neuropilin 1-mediated Sema3A signals in patterning of the sympathetic nervous system. *Development* **129**, 671-680.

Kazanskaya, O., Glinka, A. y Niehrs, C. (2000). The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Development* **127**(22), 4981-4992.

Kim, J., Lo, L., Dormand, E. y Yerson, D. J. (2003). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* **38**, 17-31.

Knecht, A. K. y Bronner-Fraser, M. (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat. Rev. Genet.* **3**(6), 453-461.

Köntges, G. y Lumsden, A. (1996). Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **122**(10), 3229-3242.

Kos, R., Reedy, M. V., Johnson, R. L. y Erickson, C. A. (2001). The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development* **128**, 1467-1479.

Kulesa, P., Ellies, D. L. y Trainor, P. A. (2004). Comparative analysis of neural crest cell death, migration, and function during vertebrate embryogenesis. *Dev. Dyn.* **229**(1), 14-29.

LaBonne, C. y Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development* **125**, 2403-2414.

LaBonne, C. y Bronner-Fraser, M. (2000). Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* both for induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev. Biol.* **221**, 195-205.

Lallier, T., Deutzmann, R., Perris, R. y Bronner-Fraser M. (1994) Neural crest cell interactions with laminin: structural requirements and localization of the binding site for alpha 1 beta 1 integrin. *Dev. Biol.* **162**(2), 451-464.

Lallier, T., Leblanc, G., Artinger, K. B. y Bronner-Fraser, M. (1992) Cranial and trunk neural crest cells use different mechanisms for attachment to extracellular matrices. *Development* **116**(3), 531-541.

Landolt, R. M., Vaughan, L., Winterhalter, K. H. y Zimmermann, D. R. (1995). Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* **121**(8), 2303-2312.

Laudet, V., Stehelin, D. y Clevers, H. (1993). Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res.* **21**(10), 2493-2501.

Le Douarin, N. M. y Kalcheim, C. (1999). The Neural Crest. *Cambridge, UK: Cambridge University Press.*

Lee, V. M., Sechrist, J. W., Luetolf, S. y Bronner-Fraser, M. (2003). Both neural crest and placode contribute to the ciliary ganglion and oculomotor nerve. *Dev. Biol.* **263**(2), 176-190.

Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N. y de Crombrughe, B. (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* **17**(4), 2336-2346.

Lefebvre, V., Li, P. y de Crombrughe, B. (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* **17**, 5718-5733.

Li, B., Zhang, W., Chan, G., Jancso-Radek, A., Liu, S. y Weiss, M. A. (2001) Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY – a clinical correlation. *J. Biol. Chem.* **276**, 46480–46484.

Liem, K. F. J., Tremml, G., Roelink, H. y Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-979.

Lioubinski, O., Müller, M., Wegner, M. y Sander, M. (2003). Expression of Sox transcription factors in the developing mouse pancreas. *Dev. Dyn.* **227**, 402-408.

Liu, J. y Jessell, T. M. (1998). A role for RhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural plate. *Development* **125**, 5055-5057.

Lumsden, A. (1990). The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci.* **13**(8), 329-335.

Lumsden, A., Sprawson, N. y Graham, A. (1991). Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* **113**, 1281-1291.

Mansouri, A., Stoykova, A., Torres, M., Gruss, P. (1996). Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice. *Development* **122**(3), 831-838.

Marchant, L., Linker, C., Ruiz, P., Guerrero, N., Mayor, R. (1998). The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Dev. Biol.* **198**, 319-329.

Martinsen, B. J. y Bronner-Fraser, M. (1998). Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science* **281**, 988-991.

Mayor, R., Morgan, R., Sargent, M. G. (1995). Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* **121**, 767-777.

McLarren, K., Litsiou, A. y Streit, A. (2003). DLX5 positions the neural crest and preplacode region at the border of the neural plate. *Dev. Biol.* **259**, 34-47.

McLennan, R., Krull, C. E. (2002). Ephrin-as cooperate with EphA4 to promote trunk neural crest migration. *Gene Expr.* **10**, 295-305.

Mellitzer, G., Xu, Q. y Wilkinson, D. G. (2000). Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 400-408.

Meyer, J., Sudbeck, P., Held, M., Wagner, T., Schmitz, M. L., Bricarelli, F. D., Eggermont, E., Friedrich, U., Haas, O. A., Kobelt, A., Leroy, J. G., Van Maldergem, L., Michel, E., Mitulla, B., Pfeiffer, R. A., Schinzel, A., Schmidt, H. y Scherer, G. (1997). Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 91-98.

Minichiello, J., Ben-Ya'acov, A., Hearn, C. J., Needham, B. y Newgreen, D. F. (1999). Induction of epithelio-mesenchymal transformation of quail embryonic neural cells by inhibition of atypical protein kinase-C. *Cell Tissue Res.* **295**, 195-206.

Morgan, B. A. y Fekete, D. M. (1996). Manipulating gene expression with replication-competent retroviruses. *Methods Cell Biol.* **51**, 185-218.

Mori-Akiyama, Y., Akiyama, H., Rowitch, D. H. y de Crombrughe, B. (2003). Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9360-9365.

Murphy, E. C., Zhurkin, V. B., Louis, J. M., Cornilescu, G., Clore, G. M. (2001) Structural basis for SRY-dependent 46-X,Y sex reversal: modulation of DNA bending by a naturally occurring point mutation. *J. Mol. Biol.* **312**(3), 481-499.

Nakagawa, S. y Takeichi, M. (1995). Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development* **121**, 1321-1332.

Nakagawa, S. y Takeichi, M. (1998). Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* **125**, 2963-2971.

Narayanan, C. H. y Narayanan, Y. (1980). Neural crest and placodal contributions in the development of the glossopharyngeal-vagal complex in the chick. *Anat. Rec.* **196**(1), 71-82.

Newgreen, D.F. y Minichiello, J. (1995). Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in the onset of neural crest cell migration are separable and inducible by protein kinase inhibitors. *Dev. Biol.* **170**, 91-101.

Nieto, M. A., Patel, K. y Wilkinson, D. G. (1996). In situ hybridisation analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Meth. Cell Biol.* **51**, 220-235.

Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G. y Cooke, J. (1994). Control of cell behaviour during development by Slug, a zinc finger gene. *Science* **264**, 835-839.

Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 155-166.

Niwa, H., Yamamura, K. y Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **15**, 193-199.

Northcutt, R. G. y Gans, C. (1983). The genesis of neural crest and epidermal placodes: a reinterpretation of vertebrate origins. *Q. Rev. Biol.* **58**(1), 1-28.

Oakley, R. A., Lasky, C. J., Erickson, C. A. y Tosney, K. W. (1994). Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in the chicken embryo. *Development* **120**(1), 103-114.

Paratore, C., Goerich, D. E., Suter, U., Wegner, M. y Sommer, L. (2001). Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development* **128**, 3949-3961.

Peirano, R. I., Goerich, D. E., Riethmacher, D. y Wegner, M. (2000). Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3198-3209.

Perris, R., Kuo, H. J., Glanville, R. W., Leibold, S. y Bronner-Fraser, M. (1993). Neural crest cell interaction with type VI collagen is mediated by multiple cooperative binding sites within triple-helix and globular domains. *Exp. Cell Res.* **209**(1), 103-117.

Perris, R., Perissinotto, D. (2000). Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev.* **95**(1-2), 3-21.

Perris, R., Perissinotto, D., Pettway, Z., Bronner-Fraser, M., Morgelin, M., Kimata, K. (1996). Inhibitory effects of PG-H/aggreacan and PG-M/versican on avian neural crest cell migration. *FASEB J.* **10**(2), 293-301.

Perris, R., Syfrig, J., Paulsson, M., Bronner-Fraser, M. (1993). Molecular mechanisms of neural crest cell attachment and migration on types I and IV collagen. *J. Cell Sci.* **106**(4), 1357-1368.

Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D. E., Prehu, M. O., Puliti, A., Herbarth, B., Hermans-Borgmeyer, I., Legius, E., Matthijs, G., Amiel, J., Lyonnet, S., Ceccherini, I., Romeo, G., Smith, J. C., Read, A. P., Wegner, M. y Goossens, M. (1998) SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* **18**(2), 171-173.

Potts, W.M., Olsen, M., Boettiger, D., y Vogt, V. (1987). Epitope mapping of monoclonal antibodies to gag protein p19 of avian sarcoma and leukemia viruses. *J. Gen. Virol.* **68**, 3177-3182.

Preiss, S., Argentaro, A., Clayton, A., John, A., Jans, D. A., Ogata, T., Nagai, T., Barroso, I., Schafer, A. J. y Harley, V. R. (2001) Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 27864-27872.

Raible, D. W., Wood, A., Hodsdon, W., Henion, P. D., Weston, J. A., Eisen, J. S. (1992). Segregation and early dispersal of neural crest cells in the embryonic zebrafish. *Dev. Dyn.* **195**(1), 29-42.

Rehberg, S., Lischka, P., Glaser, G., Stamminger, T., Wegner, M. y Rosorius, O. (2002) Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5826-5834.

Rickmann, M., Fawcett, J. W., Keynes, R. J. (1985). The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **90**, 437-455.

Ridley, A. J. y Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.

Rimini, R., Beltrame, M., Argenton, F., Szymczak, D., Cotelli, F. y Bianchi, M. E. (1999). Expression patterns of zebrafish sox11A, sox11B and sox21. *Mech. Dev.* **89**(1-2), 167-171.

Ring, C., Hassell, J., Halfter, W. (1996) Expression pattern of collagen IX and potential role in the segmentation of the peripheral nervous system. *Dev. Biol.* **180**(1), 41-53.

Santiago, A. y Erickson, C. A. (2002). Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development* **129**, 3621-3632.

Schepers, G. E., Teasdale, R. D. y Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev. Cell* **3**, 167-70.

Sela-Donenfeld, D. y Kalcheim, C. (1999). Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* **126**, 4749-4762.

Selleck, M. A., García-Castro, M. I., Artinger, K. B. y Bronner-Fraser, M. (1998). Effects of Shh and Noggin on neural crest formation demonstrate that BMP is required in the neural tube but not ectoderm. *Development* **125**, 4919-4930.

Serbedzija, G. N., Fraser, S. E., Bronner-Fraser, M. (1990). Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. *Development* **108**, 605-612.

Smith, A., Robinson, V., Patel, K. y Wilkinson, D. G. (1997). The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Curr. Biol.* **7**, 561-570.

Smith, J. M. y Koopman, P. A. (2004). The ins and outs of transcriptional control: nucleocytoplasmic shuttling in development and disease. *Trends Genet.* **20**(1), 4-8.

Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrughe, B. y Lefebvre, V. (2001). The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* **1**, 277-290.

Sock, E., Schmidt, K., Hermanns-Borgmeyer, I., Bosl, M. R. y Wegner, M. (2001) Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol. Cell. Biol.* **21**(20), 6951-6959.

Somasiri, A., Howarth, A., Goswami, D., Dedhar, S. y Roskelley, C.D. (2001). Overexpression of the integrin-linked kinase mesenchymally transforms mammary epithelial cells. *J. Cell. Sci.* **114**, 1125-1136.

Spokony, R. F., Aoki, Y., Saint-Germain, N., Magner-Fink, E. y Saint-Jeannet, J. P. (2002). The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development* **129**(2), 421-432.

Stark, M. R., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M., y Marcelle, C. (1997). Neural tube-ectoderm interactions are required for trigeminal placode formation. *Development* **124**, 4287–4295.

Stock, D. W., Buchanan, A. V., Zhao, Z. y Weiss, K. M. (1996). Numerous members of the Sox family of HMG box-containing genes are expressed in developing mouse teeth. *Genomics* **37**(2), 234-237.

Streit, A., Lee, K. J., Woo, I., Roberts, C., Jessell, T. M. y Stern, C. D. (1998). Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Development* **125**, 507–519.

Streit, A., Stern, C. D. (1999). Establishment and maintenance of the border of the neural plate in the chick: involvement of FGF and BMP activity. *Mech. Dev.* **82**(1-2), 51-66.

Takamatsu, N., Kanda, H., Tsuchiya, I., Yamada, S., Ito, M., Kabeno, S., Shiba, T. y Yamashita, S. (1995). A gene that is related to SRY and is expressed in the testes encodes a leucine zipper-containing protein. *Mol. Cell Biol.* **15**(7), 3759-3766.

Thiery, J. P., Duband, J. L., Rutishauser, U., Edelman, G. M. (1982). Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79**(21), 6737-6741.

Tosney, K. W. (1982). The segregation and early migration of cranial neural crest cells in the avian embryo. *Dev. Biol.* **89**, 13-24.

Tucker, G. C., Aoyama, H., Lipinski, M., Tirsz, T. y Thiery, J. P. (1984). Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and NC-1: conservation in vertebrates on cells derived from the neural primordium and on some leukocytes. *Cell Differ.* **14**, 223-230.

Uwanogho, D., Rex, M., Cartwright, E. J., Pearl, G., Healy, C., Scotting, P. J. y Sharpe, P. T. (1995). Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. *Mech. Dev.* **49**(1-2), 23-36.

van Houte, L. P., Chuprina, V. P., van der Wetering, M., Boelens, R., Kaptein, R. y Clevers, H. (1995). Solution structure of the sequence-specific HMG box of the lymphocyte transcriptional activator Sox-4. *J. Biol. Chem.* **270**(51), 30516-30524.

Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P. y Mayor, R. (2002). Posterization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev. Biol.* **241**, 289-301.

Wakamatsu, Y., Endo, Y., Osumi, N. y Weston, J. A. (2004). Multiple roles of Sox2, an HMG-box transcription factor in avian neural crest development. *Dev. Dyn.* **229**(1), 74-86.

Wang, H. U. y Anderson, D. J. (1997). Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron* **18**(3), 383-396.

Werner, M. H. y Burley, S. K. (1997) Architectural transcription factors: proteins that remodel DNA. *Cell* **88**(6), 733-736.

Weston, J. A. y Butler, S. L. (1966). Temporal factors affecting localization of neural crest cells in the chicken embryo. *Dev. Biol.* **14**, 246-266.

Wilson, M. y Koopman, P. (2002). Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**(4), 441-446.

Wilson, P. A. y Hemmati-Brivanlou, A. (1997). Vertebrate neural induction: inducers, inhibitors, and a new synthesis. *Neuron* **18**, 699-710.

Woda, J., Pastagia, J., Mercola, M. y Artinger, K. (2003). Dlx proteins position the neural plate border and determine adjacent cell fates. *Development* **130**, 331–342.

Yang, L., Zhang, H., Hu, G., Wang, H., Abate-Shen, C., Shen, M. M. (1998). An early phase of embryonic *Dlx5* expression defines the rostral boundary of the neural plate. *J. Neurosci.* **18**, 8322–8330